

**IMPROVED IMMUNODIAGNOSTIC ASSAYS USING REDUCING AGENTS****Publication number:** JP2002512370T**Publication date:** 2002-04-23**Inventor:****Applicant:****Classification:**

**- international:** G01N33/531; A61K38/00; A61K39/29; A61K45/00; A61P31/14; A61P43/00; C07K1/22; C07K14/18; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/00; C12N15/09; C12P21/02; C12Q1/25; C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/543; G01N33/573; G01N33/576; G01N33/531; A61K38/00; A61K39/29; A61K45/00; A61P31/00; A61P43/00; C07K1/00; C07K14/005; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/00; C12N15/09; C12P21/02; C12Q1/25; C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/543; G01N33/573; G01N33/576; (IPC1-7): G01N33/543; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/00; C12N15/09; C12Q1/25; C12Q1/68; G01N33/573; G01N33/576

**- european:** C07K14/18; C07K14/18F4; C12Q1/70B6A; G01N33/543B; G01N33/543M; G01N33/576; G01N33/576F

**Application number:** JP20000545027T 19990415**Priority number(s):** EP19980870087 19980417; WO1999EP02547 19990415**Also published as:**

WO9954735 (A1)  
JP2005185285 (A)  
CA2324970 (A1)  
TR200202213T (T2)  
TR200003024T (T2)  
DE69920895T (T2)  
AU751362 (B2)

less &lt;&lt;

**Report a data error here**

Abstract not available for JP2002512370T

Abstract of corresponding document: **WO9954735**

The present invention relates to a solid phase immunoassay comprising on said solid phase an antigen in the presence of a reducing agent. The present invention also relates to a method for purifying a cysteine containing recombinantly expressed protein comprising at least 2, preferably 3 or 4 and even more preferably all of the following steps: (a) sulphonation of a lysate from recombinant host cells or lysis of recombinant host cells in the presence of guanidinium chloride followed by a subsequent sulphonation of the cell lysate, (b) treatment with a zwitterionic detergent, preferably after removal of the cell debris, (c) purification of the sulphonated version of the recombinant protein or purification of the sulphonated version of the recombinant protein with subsequent removal of the zwitterionic detergent, with said purification being preferably chromatography, more preferably a Ni-IMAC chromatography with said recombinant protein being a His-tagged recombinant protein, (d) desulphonation of the sulphonated version of the recombinant protein, preferably with a molar excess of DTT, (e) storage in the presence of a molar excess of DTT. The present invention also relates to novel HCV NS3 sequences as depicted in Figures 1-8.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号  
特表2002-512370  
(P2002-512370A)

(43) 公表日 平成14年4月23日 (2002.4.23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N 33/543	5 4 5	G 0 1 N 33/543	5 4 5 B
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	
1/19		1/19	
1/21		1/21	
5/10		9/00	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 60 頁) 最終頁に統く	
(21) 出願番号	特願2000-545027(P2000-545027)	(71) 出願人	イノジエティックス・ナムローゼ・フェンノートシャッブ INNOGENETICS N. V. ベルギー、バー-9052ヘント、テヒノロギーパルク6番
(86) (22) 出願日	平成11年4月15日(1999.4.15)	(72) 発明者	ヘルト・メールテンス ベルギー、バー-8310ブルッヘ、ジルファースパレンストラート64番
(85) 翻訳文提出日	平成12年10月17日(2000.10.17)	(72) 発明者	ヨースト・ロウワヒー ベルギー、バー-2070ズウェインドレヒト、マルセリストラート45番
(86) 国際出願番号	PCT/EP99/02547	(74) 代理人	弁理士 青山 葵 (外1名)
(87) 国際公開番号	WO99/54735		
(87) 国際公開日	平成11年10月28日(1999.10.28)		
(31) 優先権主張番号	9 8 8 7 0 0 8 7. 8		
(32) 優先日	平成10年4月17日(1998.4.17)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 還元剤を用いる改良された免疫診断アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、還元剤の存在下における固相上の抗原を含む固相イムノアッセイに関する。さらに本発明は、少なくとも2つ、好ましくは3つまたは4つ、さらに好ましくはすべての下記工程：(a) 組み換え宿主細胞からの溶解物をスルホン化すること、あるいは塩化グアニジウムの存在下で組み換え宿主細胞を溶解させて細胞溶解物をスルホン化すること、(b) 好ましくは細胞残渣を除去した後に、両性イオン性界面活性剤で処理すること、(c) スルホン化組み換え蛋白を精製すること、あるいはスルホン化組み換え蛋白を精製し、その後両性イオン性界面活性剤を除去すること、ここに好ましくは、精製はクロマトグラフィー、より好ましくはN1-IMACクロマトグラフィーであり、組み換え蛋白はH1s-タグを付した組み換え蛋白である、(d) 好ましくはモル過剰のDTTのごとき還元剤でスルホン化組み換え蛋白を脱スルホン化すること、(e) モル過剰のDTTの存在下で貯蔵することを含む、システイン含有組み換え発現蛋白の精製方法に関する。また本発明は、図1～8に示される新規HCV NS3配列にも関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 還元剤の存在下における固相上の抗原を含む固相イムノアッセイ。

【請求項2】 抗原を固相に被覆、ブロッキングおよび／または固定する工程の間に、あるいは固相の前処理の間に還元剤が添加される、請求項1記載のイムノアッセイを製造または実行する方法。

【請求項3】 抗原を固相に被覆する工程の間に還元剤が固相に添加される請求項2記載の方法。

【請求項4】 還元剤の存在下または不存在下において適用された抗原を含む固相をブロックする工程の間に還元剤が固相に添加される請求項2記載の方法。

【請求項5】 還元剤の存在下または不存在下において適用された抗原を含む固相を固定する工程の間に還元剤が固相に添加される請求項2記載の方法。

【請求項6】 還元剤の存在下または不存在下において適用された抗原を含む固相を前処理する間に還元剤が添加される請求項2記載の方法。

【請求項7】 還元剤がDTT、DTEまたはTCEPである請求項1ないし6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 還元剤が0.1 mMないし1 M、より詳細には0.5 mMないし500 mM、さらに詳細には1 mMないし250 mMの範囲の濃度で使用され、いくつかの適用例においては0.5ないし50 mM、1ないし30 mM、2ないし20 mM、または5ないし15 mMの範囲、または約10 mMが必要となりうるである、請求項1ないし7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 抗原がHCV NS3蛋白である請求項2ないし8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 請求項2ないし9のいずれかに記載の方法により製造される固相イムノアッセイ。

【請求項11】 請求項2ないし9のいずれかの方法により製造されるELISA。

【請求項12】 被覆および／または固定工程において還元剤が添加される

請求項11記載のE L I S A。

【請求項13】 請求項2ないし9のいずれかに記載の方法により製造されるQ U I C K試験。

【請求項14】 ブロッキング工程において還元剤が添加される請求項13記載のQ U I C K試験。

【請求項15】 請求項2ないし9のいずれかに記載の方法により製造されるラインイムノアッセイ。

【請求項16】 ブロッキング工程において還元剤が添加される請求項15記載のラインイムノアッセイ。

【請求項17】 請求項1記載の抗原に対して生成した抗体のインビトロでの診断のための請求項10ないし16のいずれかに記載のアッセイの使用。

【請求項18】 スルホン化およびその後の脱スルホン化の工程を含む方法により処理されるH C V N S 3蛋白。

【請求項19】 さらに両性イオン性界面活性剤、好ましくはエムピゲンで処理されるH C V N S 3蛋白。

【請求項20】 少なくとも2つ、好ましくは3つまたは4つ、さらに好ましくはすべての下記工程：

(a) 組み換え宿主細胞からの溶解物をスルホン化すること、あるいは塩化グアニジウムの存在下で組み換え宿主細胞を溶解させて細胞溶解物をスルホン化すること、

(b) 好ましくは細胞残渣を除去した後に、両性イオン性界面活性剤で処理すること、

(c) スルホン化組み換え蛋白を精製すること、あるいはスルホン化組み換え蛋白を精製し、その後両性イオン性界面活性剤を除去すること、ここに好ましくは、精製はクロマトグラフィー、より好ましくはN i - I M A Cクロマトグラフィーであり、組み換え蛋白はH i s - タグを付した組み換え蛋白である、

(d) 好ましくはモル過剰のD T Tのごとき還元剤でスルホン化組み換え蛋白を脱スルホン化すること、

(e) モル過剰のD T Tの存在下で貯蔵すること、あるいは即座にアッセイに使

用すること

を含む、システイン含有組み換え発現蛋白の精製方法。

【請求項21】 図1に示されるポリペプチド（配列番号：3～18）をコードするHCVポリ核酸あるいはHCVポリ核酸のユニークな部分、より詳細には図2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1または8-1（配列番号：19、21、23、25、27、29および31）に示された配列を有するポリ核酸。

【請求項22】 図2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1または8-1に示され、その産物が疑陽性HCV試料と反応しないという事実により特徴づけられる請求項21記載のポリ核酸、あるいは疑陽性HCV試料と反応しないNS3エピトープをコードしている該ポリ核酸の部分。

【請求項23】 請求項21または22記載のポリ核酸を含む組み換えベクター。

【請求項24】 請求項23記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項25】 請求項21または22記載の核酸配列を検出する方法であつて、

該核酸をプローブと接触させ；

該核酸と該プローブとの間に形成された複合体を調べることを含む方法。

【請求項26】 請求項21または22記載の核酸の検出のためのプローブまたはプライマーとして使用される、請求項21または22記載の単離核酸またはそのフラグメント。

【請求項27】 請求項26記載の少なくとも1つのプライマーおよび/または少なくとも1つのプローブを含む、請求項21または22記載の核酸配列の検出のためのキット。

【請求項28】 請求項21または22記載のポリ核酸によりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列の一部または全体を有するHCVポリペプチド。

【請求項29】 S1200、A1218、A1384、P1407、V1412、P1424もしくはF1444のいずれか、またはこれらのアミノ酸と

L1201、S1222、I1274、S1289、T1321、A1323、  
T1369、L1382、V1408、A1409もしくはF1410のいずれかとの組み合わせを含むHCV NS3ヘリカーゼ蛋白またはHCV NS3ヘリカーゼ蛋白の部分。

【請求項30】 請求項28または29記載のポリペプチド、またはその機能的に同等な変種またはフラグメントを含む医薬組成物。

【請求項31】 HCV感染を予防または治療するための医薬として使用される、請求項28または29記載のポリペプチド、またはその機能的に同等な変種またはフラグメントを含む医薬組成物。

【請求項32】 請求項28または29記載のポリペプチドを検出する方法であって、

該ポリペプチドを該ポリペプチドに結合するリガンドと接触させ、該ポリペプチドと該リガンドとの間に形成された複合体を調べることを含む方法。

【請求項33】 請求項28または29記載のポリペプチドに結合するリガンド。

【請求項34】 医薬上許容される賦形剤と混合された請求項33記載の少なくとも1つのリガンドを含む、医薬として使用される組成物。

【請求項35】 診断または治療目的の請求項28または29記載のポリペプチドの製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は、HCV感染の診断および治療の分野に関する。より詳細には、本発明は、HCV NS3ヘリカーゼおよびその使用に関する。また本発明は、改良された免疫診断アッセイにも関する。

## 【0002】

## 発明の背景

C型肝炎ウイルス (HCV) はフラビウイルス科中の属を構成しており、G型およびG B型肝炎ウイルスならびにペストウイルスに対して相同性を有する。プラス鎖RNAゲノムは少なくとも9個の蛋白をコードしている。コア、E 1 およびE 2 は構造蛋白を構成する。NS 2、NS 3、NS 4 A、NS 4 B、NS 5 A およびNS 5 Bは非構造 (NS) 蛋白である。HCV単離体は高レベルの配列異種性を示し、少なくとも11タイプおよび90サブタイプに分類される (Maertens and Stuyver, 1997)。ヒト肝臓へのHCVの感染は、しばしば、臨床的に良性であり、急性フェーズにおいて弱い黄疸を伴う。急激に寛解するC型肝炎のいくつかの場合には、疾病は気づかれない可能性がある。しかしながら、大部分のケース (> 70%) において、HCV感染は慢性の持続的なまたは活性のある感染となり、しばしば、肝硬変および自己免疫性疾患といった合併症を伴う。肝細胞癌腫が約20ないし35年後に生じる可能性があり (Saito et al., 1990)、肝硬変の中間フェーズを伴わない場合がある。今日、予防策はなく、HCV遺伝子型によっては、インターフェロン- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) での治療のみが治療ケースの約4ないし36%において長期の寛解を引き起こす (Maertens and Stuyver, 1997)。

## 【0003】

HCVの生産的培養方法が現在利用できず、ごくわずかな量のHCV抗原しか感染患者体内を循環していないので、HCV粒子の直接的検出をルーチンに行うことはできず、HCV RNAを検出するために面倒な増幅方法を用いる間接的診断のみが可能である。他の多くのウイルス感染とは異なり、一般的には、大部

分のHCV蛋白に対する細胞性および体液性免疫応答の存在にもかかわらずHCV粒子は血液、肝臓およびリンパ球中に持続的に存在する。便利には、HCV抗体をELISA法により検出することができ、そのことにより血液銀行および臨床研究室における高処理量スクリーニングが可能となる。補足的な抗体試験が必要であり、現在、多くの国において必須となっている。このようにして真のHCVの反応性が偽の反応性から区別されるが、偽の反応性は、被覆剤もしくはプロッキング剤への、またはHCV抗原調合物中に存在する汚染混入物質への、または組み換え抗原自体の融合部分もしくは非特異的領域への血清または血漿の免疫グロブリンまたは抗イディオタイプ成分の非特異的結合により生じる可能性がある (McFarlane et al., 1990)。慢性HCV疾病、特に治療中のものをモニターするために、PCRまたは分枝DNA (bDNA) 法によるHCV RNAの検出が最近になって導入された。驚くべきことに、繰り返してHCV Ab陽性である患者のわずか~70ないし94%がネステッドPCRにより陽性となるという事実にもかかわらず、HCV RNAの検出は、しばしば、HCV Abスクリーニング試験を確認するために使用されている (Martin et al., 1994)。通常には温和な形態の疾病を示し、低いHCV RNAレベルであるHCV Ab陽性血ドナーのうち、ネステッドPCRにより確認されるのは~40%のオーダーである (Waumans et al., 1993; Stuyver et al., 1996)。それゆえ、片をベースにしたアッセイ (strip-based assay) はHCV Abの確認のためのわずかに信頼できる別法を提供するものである。確認アッセイにおける中間的結果の場合、患者についてHCV RNAの検出よりもむしろ血清学的フォローアップが推奨される (Di Bisceglie et al., 1998)。生の (native) HCV抗原は十分な量の使用ができないので、かかる確認アッセイには合成ペプチドおよび/またはHCV蛋白の組み換えフラグメントが用いられる。抗体確認において最も臨床的に用いられるのはNS3蛋白の反応性である (Zaaijer et al., 1994)。しばしばNS3抗体は一連のセロコンバージョンの最初に出現し、NS3蛋白の反応性は現在利用可能な個々の市販アッセイにおいて異なると思われる。

#### 【0004】

イノジエネティックス (Innogenetics) は、通常には合成ペプチドと組み換え

蛋白との組み合わせを序列化され容易に読み取れるようになった個別の線として適用する、片による方法 (strip technology) の概念を導入した。INNO-LIA HIV Ab試験はルーチンに使用されるウェスタンプロットよりも優れていることが証明された (Pollet et al., 1990)。Line Immuno Assayは多パラメーター試験を可能にし、かくしてカットオフおよび他の評価システムならびに試料添加コントロールを可能にし、さらにELISA試験におけるいくつかの抗原に必要な担体または融合パートナーとして用いられる非HCV蛋白に関する偽の反応性の試験も可能とした。原理的には、該試験フォーマットは異なる病原体または表現型的にリンクした条件を单一試験において組み合わせることを可能にする。

#### 【0005】

INNO-LIA HCV Ab IIIは、コア領域、E 2超可変領域 (HVR) 、NS3ヘリカーゼ領域、ならびにNS4A、NS4BおよびNS5A領域に由来するHCV抗原を含む第3世代のLine Immuno Assayである。当該第3世代のアッセイにおいて、高度に精製された組み換えサブタイプ1b NS3蛋白およびE 2ペプチドにより高感度が実現される一方で、ペプチドをベースにした試験の特徴である信頼できる特異性 (Peeters et al., 1993) が担保されている。おそらく、このアッセイの最も重要な特徴の1つは、今までにないHCV RNA陽性との相関関係である (Claeys et al., 1992; De Beenhouwer et al., 1992)。

#### 【0006】

抗原は6本の別個の線としてプラスチックで裏打ちされたナイロン片上に被覆される。さらに、4種の対照線、すなわち、抗ストレプトアビジン、3+陽性対照 (抗ヒトIg) 、1+陽性対照 (ヒトIgG) 、および土カットオフ線が各片上に被覆される。希釈された試験試料をLIA III片と一緒にインキュベーションする。HCV抗体が試験試料中に存在する場合には、HCV抗体が片上のHCV抗原線に結合するであろう。次いで、アフィニティー精製されたアルカリ性ホスファターゼで標識したヤギ抗ヒトIgG (H+L) 抱合体が添加され、特異的なHCV抗原／抗体複合体が生成されている場合にはこれと反応する。酵素基質とのインキュベーションにより栗色が生じ、その強度は試料から捕獲された特定線上のHCV特異的抗体量に比例する。硫酸を用いて発色を停止させる。HCV特

異的抗体が存在しない場合、抱合体のみが土、1+、および3+対照線に結合する。試料を添加しない場合には、土および1+対照線のみが染色される。

### 【0007】

#### 定義

以下の定義は本明細書に用いられる異なる用語および表現を説明するものである。

用語「HCV NS 3」は、HCV NS 3 プロテアーゼまたはヘリカーゼのいずれかの少なくとも1つのエピトープを示すアミノ酸配列（および／またはアミノ酸アナログ）を含むポリペプチドまたはそのアナログ（例えば、ミモトープ（*mimotopes*））をいう。

用語「C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白」は、E 1 またはE 2 領域のいずれかの少なくとも1つのHCVエピトープを示すアミノ酸配列（および／またはアミノ酸アナログ）を含むポリペプチドまたはそのアナログ（例えば、ミモトープ）をいう（WO96/04385参照、参照により本明細書に一体化させる）。

本発明の実施例セクションにおいて使用される単離体（生物学的試料）は本発明を限定するものでなく、タイプ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12または他の新たなHCV遺伝子型に属するHCV単離体は本発明の実施に適したHCV配列源であることも理解されるはずである。

### 【0008】

本発明に使用するHCV抗原は全長ウイルス蛋白、その実質的に全長のバージョン、あるいはそれらの機能的フラグメント（例えば、エピトープの形成または保持に必須の配列を失っていないフラグメント）であってもよい。さらにそのうえ、本発明のHCV抗原は、目的のコンホーメーション的エピトープの形成をブロックまたは妨害しない他の配列を包含しうる。抗体（ポリクローナル血清またはモノクローナル抗体）を用いて目的抗原をスクリーニングし、その反応性を、直鎖状エピトープ（存在する場合に）を保持している変性バージョンの抗原の反応性と比較することにより、コンホーメーション的エピトープの存在または不存在を容易に調べることができる。かかるスクリーニングにおいてポリクローナル抗体を用いる場合、最初にポリクローナル血清を変性抗原に吸着させ、それが目

的抗原に対する抗体を保持しているかどうかを調べることが有利であるかもしれない。

#### 【0009】

用語「融合ポリペプチド」は、ポリペプチド中において、抗原が、詳細にはHCV抗原が天然には存在しない1本の連続したアミノ酸鎖の一部となっているポリペプチドを意味する。ペプチド結合によりHCV抗原を互いに直接連結することができ、スペーサーアミノ酸配列により分離することができる。融合ポリペプチドはHCVに関して外来性のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

用語「固相」または「固体支持体」は、個々のHCV抗原またはHCV抗原含有融合ポリペプチドが共有結合され、あるいは疎水的吸着のごとき手段により非共有結合される固体を意味する。固相の例はマイクロタイタープレート、ナイロンまたはニトロセルロース片のごとき膜片、およびシリコンチップを包含する。

用語「生物学的試料」は、通常には個体により生成された抗体、詳細にはHCVに対する抗体を含有する、哺乳動物個体（例えば、類人猿、ヒト）の体液または組織を意味する。体液または組織はHCV抗原を含んでいてもよい。かかる成分は当該分野において知られており、血液、血漿、血清、尿、脊髄液、リンパ液、呼吸器、腸管もしくは性器分泌物、涙、唾液、乳、白血球細胞および骨髄腫を包含するが、これらに限らない。体成分は生物学的液体を含む。用語「生物学的液体」は器官から得られる液体をいう。いくつかの生物学的液体は、凝固因子（例えば、因子VIII）、血清アルブミン、成長ホルモン等のごとき他の生成物の源として使用される。かかる場合において、生物学的液体の源がHCVのごときウイルスによるコンタミネーションがないことが重要である。

#### 【0010】

用語「免疫学的に反応性のある」は、問題となる抗原がHCV感染個体または免疫個体由来の体成分中の存在する抗HCV抗体と特異的に反応することを意味する。

用語「免疫複合体」は、抗体がエピトープまたは抗原に結合した場合に形成される複合体を意味する。

本明細書の用語E1およびE2は、W096/04385中に十分に記載されており、該

文献を参照により本明細書に一体化させる。

【0011】

蛋白に用いられる用語「精製」は、所望蛋白が組成物中の全蛋白成分の少なくとも35%を占めている組成物をいう。好ましくは、所望蛋白は全蛋白成分の少なくとも40%、より好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約60%、さらに好ましくは少なくとも約70%、さらにより好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは、少なくとも約85%、さらにより好ましくは少なくとも約90%、最も好ましくは少なくとも約95%を占める。純度のパーセンテージ決定に影響しない場合には、組成物は炭水化物、塩類、脂質、溶媒等のごとき他の成分を含んでいてもよい。「単離」HCV蛋白は、純度が少なくとも35%であるHCV蛋白成分を意味する。

用語「本質的に精製された蛋白」は、インビトロ診断法に使用され、治療化合物として使用されるように精製されている蛋白をいう。これらの蛋白は細胞の蛋白またはDNA、ベクター由来の蛋白またはDNA、あるいは他のHCVウイルス性成分を実質的に含まない。通常には、これらの蛋白は均質に精製されている（少なくとも純度80%、好ましくは85%、より好ましくは90%、より好ましくは95%、より好ましくは97%、より好ましくは98%、より好ましくは99%、さらにより好ましくは99.5%、最も好ましくはSDS-PAGEおよび銀染色のような慣用的方法によっては混入蛋白が検出されない）。

【0012】

本明細書の用語「組み換え発現」は、本発明蛋白が、以下に詳述する原核細胞、下等もしくは高等真核細胞において組み換え発現法により製造されるという事実をいう。

用語「下等真核細胞」は、酵母、真菌等のごとき宿主細胞をいう。一般的には、下等真核細胞は単細胞である（必ずしもそうでなくもよい）。好ましい下等真核細胞はSaccharomyces、Schizosaccharomyces、Klyveromyces、Pichia（例えば、Pichia pastoris）、Hansenula（例えば、Hansenula polymorpha）、Yarrowia、Schwanniomyces、Zygosaccharomyces等である。Saccharomyces cerevisiae、S. carlsbergensisおよびK. lactisは最も普通に使用される酵母宿主である。

## 【0013】

用語「原核細胞」は、*E. coli*、*Lactobacillus*、*Lactococcus*、*Salmonalla*、*Streptococcus*、*Bacillus subtilis*または*Streptomyces*のごとき宿主をいう。これらの宿主も本発明の範囲内であると考える。

用語「高等真核細胞」は、哺乳動物、爬虫類、昆虫等のごとき高等動物由來の宿主細胞をいう。現在好ましい高等真核宿主細胞はチャイニーズハムスター由來（例えば、CHO）、サル由來（例えば、COSおよびVERO細胞）、幼若ハムスター腎臓由來（BHK）、ブタ腎臓由來（PK15）のもの、ウサギ腎臓13細胞（RK13）、ヒト骨肉腫細胞系143B、ヒト細胞系HeLaおよびHePG2のようなヒト肝癌細胞系、ならびに昆虫細胞系（例えば、*Spodoptera frugiperda*）由來のものである。宿主細胞は懸濁液またはフラスコ培養物、組織培養物、器官培養物等として提供されうる。あるいはまた、宿主細胞はトランスジェニック動物であってもよい。

## 【0014】

用語「ポリペプチド」はアミノ酸のポリマーをいい、特定の長さの生成物をいうのではない。よって、ペプチド、オリゴペプチドおよび蛋白はポリペプチドの定義に含まれる。またこの用語はポリペプチドの発現後修飾物、例えば、糖鎖付加物、アセチル化物、リン酸化物等を排除するものではない。例えば、1またはそれ以上のアミノ酸アナログ（例えば、非天然アミノ酸、PNA等を包含）を含有するポリペプチド、置換結合を有するポリペプチド、ならびに当該分野において知られた他の天然および非天然修飾物がこの定義に含まれる。

## 【0015】

用語「組み換えポリヌクレオチド」は、その起源または取り扱いに応じて、ポリヌクレオチドまたはゲノムの核酸、cDNA、半合成または合成のものを意味し、以下のものがある：（1）天然において結合しているポリヌクレオチドの全体または一部分に結合していないもの、（2）天然において結合しているポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに結合しているもの、あるいは（3）天然において存在しないもの。

## 【0016】

用語「組み換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系」、「細胞培養物」、ならびに単細胞として培養された微生物または高等真核細胞系を示す他のかかる用語は、組み換えベクターまたは他の導入ポリヌクレオチドのレシピエントとして用いることのできる、あるいは用いられている細胞をいい、トランسفエクションされた元の細胞の子孫を包含する。単一の親細胞の子孫は、自然、偶発的または人工的な変異のため、形態またはゲノムもしくは全DNA相補性において必ずしも親と同じでなくてもよい。

#### 【0017】

用語「レプリコン」は遺伝学的エレメント、例えば、プラスミド、染色体、ウイルス、コスミド等であり、細胞中でポリヌクレオチド複製の自律的単位として挙動するもの、すなわち、自分自身の制御下で複製しうるものである。

用語「ベクター」は、所望オープニングフレームの複製および／または発現を提供する配列をさらに含むレプリコンである。

#### 【0018】

用語「制御配列」は、連結されているコーディング配列の発現を起こさせるのに必要なポリヌクレオチド配列をいう。かかる制御配列の性質は宿主生物により異なる。原核細胞においては、一般的にかかる制御配列はプロモーター、リボソーム結合部位、およびターミネーターを含む。真核細胞においては、一般的にかかる制御配列はプロモーターを含み、エンハンサーを含んでいてもよい。用語「制御配列」は、最少でも、存在が有利であるさらなる成分、例えば、分泌をつかさどるリーダー配列を含んでいてもよい。

#### 【0019】

用語「プロモーター」は、RNAポリメラーゼをDNA鑄型に結合させて、隣接する構造遺伝子に対する正常転写開始部位におけるmRNA生成を開始させるコンセンサス配列を含むヌクレオチド配列である。

「作動可能に連結」なる表現は、そのように説明される成分が意図される様式で機能するような関係にある並置をいう。制御配列に適合した条件下でコーディング配列の発現が達成されるように制御配列がコーディング配列に「作動可能に連結」される。

「オープンリーディングフレーム」(ORF)は、選択されたリーディングフレーム中のポリペプチドをコードしているが停止コドンを含まないポリヌクレオチド配列の領域をいう。この領域はコーディング配列の一部またはコーディング配列全体であってもよい。

「コーディング配列」は、適当な調節配列の制御下に置かれた場合、mRNAおよび／またはポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチド配列である。5'末端のスタートコドンおよび3'末端の翻訳停止コドンの翻訳によってコーディング配列の境界が決定される。コーディング配列はmRNA、ウイルスRNA、DNA(cDNAを包含)、および組み換えポリヌクレオチド配列を包含しうるが、これらに限らない。

#### 【0020】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は免疫反応性のあるアミノ酸配列を意味する。一般的には、エピトープは少なくとも3個または4個のアミノ酸からなり、より通常には少なくとも5個または6個のアミノ酸、時々、約7個ないし8個、あるいは約10個のアミノ酸からなる。本明細書において用いるように、ポリペプチドのエピトープとは、該ポリペプチド中のエピトープと同じアミノ酸配列ならびにその免疫学的同等物をいう。また、かかる同等物は、例えば、遺伝子型1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2h, 2i, 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4i, 4j, 4k, 4l, 5a, 5b, 6a, 6b, 6c, 7a, 7b, 7c, 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 11a, 12aに属する現在知られている配列または株あるいは新たに決定されたHCV(サブ)タイプの株、サブタイプ(=遺伝子型)またはタイプ(グループ)特異的変種を包含する。エピトープを構成するアミノ酸は直鎖状配列の部分である必要はないが、いずれかの数のアミノ酸からなる1個またはそれ以上の列をなして散在し、かくしてコンホーメーション的エピトープを形成していてもよいことが理解されるべきである。

用語「免疫原性」は、体液性および／または細胞性の応答を引き起こす物質の能力をいい、該物質はアジュバント存在下または不存在下において、単独であっても、担体に結合していてもよい。「中和」は、感染性物質の感染性を不完全ま

たは完全にブロックする免疫応答をいう。「ワクチン」はHCVに対する不完全または完全な防御を誘導しうる免疫学的組成物である。治療ワクチンと呼ばれる場合には、ワクチンは個体の治療にも有用でありうる。

用語「治療的」は、HCV感染を治療しうる組成物をいう。

「有効量」は、投与された個体において免疫学的応答を誘導するに十分、あるいは意図された系（例えば、イムノアッセイ）において検出可能に免疫反応するに十分なエピトープを有するポリペプチドの量をいう。好ましくは、有効量は、上で定義した治療を行うに十分な量である。正確な必要量は適用例により異なるであろう。

#### 【0021】

「抗体」はポリクローナルまたはモノクローナル抗体をいう。用語「モノクローナル抗体」は、均一な抗体集団を有する抗体組成物をいう。当該用語は抗体の種または源に限定されず、さらにまた作成方法にも限定されない。ヒト化抗体、1本鎖抗体あるいは該抗体の特異性をほぼ保持しているそれらの他のフラグメントが本発明によりカバーされることにも留意すべきである。

本明細書の用語「ヒト化抗体」は、免疫グロブリンのフレームワーク領域の少なくとも一部分がヒト免疫グロブリン配列に由来することを意味する。

本明細書の用語「1本鎖抗体」は、結合抗体の結合ドメイン（重鎖および軽鎖の両方）を決定し、結合機能の保存を可能にする連結部分を提供することにより調製される抗体をいう。

本明細書の用語「（抗体の）フラグメント」は、元の抗体の抗原結合機能および特異性を保持している $F_{ab}$ 、 $F_{(ab)2}$ 、 $F_v$ および他のフラグメントをいう。

#### 【0022】

##### 発明の目的

改良されたHCV診断アッセイ成分および治療蛋白を提供することが本発明の目的である。

より詳細には、HCV抗体の診断および／またはHCVの治療に使用する改良されたHCV NS3蛋白調合物を提供することが本発明の目的である。

固相上に存在する組み換えまたは合成NS3ヘリカーゼ蛋白またはその一部分

とHCV抗体との反応性を増大させる方法を提供することが本発明のさらなる目的である。

システイン含有組み換え蛋白、より詳細には、組み換えHCV蛋白の新規精製方法を提供することも本発明の目的である。

新たなHCV NS3蛋白コーディング配列を提供することも本発明の目的である。

産物が疑陽性HCV試料とは反応しない新たなHCV NS3蛋白コーディング配列を提供することも本発明の目的である。

本発明の核酸を検出する方法を提供することも本発明の目的である。

本発明の核酸を検出するためのプローブおよびプライマーを提供することも本発明の目的である。

本発明の核酸を検出するための診断キットを提供することも本発明の目的である。

新たなHCV NS3ポリペプチドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

疑陽性HCV試料とは反応しない新たなHCV NS3ポリペプチドを提供することが本発明のもう1つの目的である。

HCV感染を予防または治療するための医薬組成物を提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のポリペプチドを検出する方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

受動免疫および/または治療に使用する本発明のポリペプチドに対する抗体を提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のポリペプチドの製造方法を提供することが本発明のもう1つの目的である。

本発明のすべての目的は、後で示す具体例に合致すると考える。

### 【0023】

#### 発明の詳細な説明

より詳細には、本発明は、還元剤の存在下における固相上の抗体を含む固相イ

ムノアッセイに関する。実施例セクションで示すように、本発明者らは、固相に対して被覆された抗原とともにDTTのごとき還元剤が存在することは、固相イムノアッセイと組み合わせた抗原を、該抗原に指向された抗体に対してずっと反応性にすることを見出した。溶液中においても、還元により抗原はより反応性となる。

本発明の還元剤はS-Sジスルフィド架橋を還元するいずれかの作用剤である。「S-S」ジスルフィド架橋の還元は化学反応であり、それによりジスルフィドが還元されてチオール(-SH)になる。WO96/04385に開示されたジスルフィド架橋破壊剤および方法を、参照により本明細書に一体化させる。「S-S」還元を、(1)酵素カスケード経路、または(2)還元性化合物により行うことができる。チオレドキシン、グルタレドキシンのような酵素はインビボにおけるジスルフィドの還元に関与することが知られており、インビトロにおける「S-S」架橋の還元に有効であることが示されている。pH7.0において還元されたチオレドキシンによりジスルフィド結合が迅速に開裂され、DTTとの反応に関する速度定数よりも約104倍大きな見かけの2次反応速度を有する。蛋白溶液を1mMのDTTまたはジヒドロリポアミドとともにプレインキュベーションすることにより還元のキネティクが劇的に増大しうる(Holmgren, 1979)。

#### 【0024】

蛋白のジスルフィド架橋を還元することのできるチオール化合物は、例えば、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリチオール(DTE)、 $\beta$ -メルカプトエタノール、チオカルバメート類、ビス(2-メルカプトエチル)スルホンおよびN, N'-ビス(メルカプトアセチル)ヒドラジン、ならびにナトリウム-チオナイトである。

アスコルビン酸または塩化すず(SnCl<sub>2</sub>)のようなチオール基を有しない還元剤は、モノクローナル抗体中のジスルフィド架橋の還元に非常に有用であることが示されており(Thakur et al., 1991)、それらをNS3の還元に使用してもよい。水素化ホウ素ナトリウムでの処理はペプチド中のジスルフィド架橋の還元に効果的であることが示されている(Gaillit, 1993)。トリス(2-カルボ

キシエチル) ホスフィン (T C E P) は低い pHにおいてジスルフィドを還元することができる (Burns et al., 1991)。DTTまたは水素化ホウ素ナトリウムを還元剤として用いる場合、セレノールはジスルフィドからチオールへの還元を触媒する。市販ジセレニドであるセレノシステアミンが触媒前駆体として使用された (Singh and Kats, 1995)。

#### 【0025】

より詳細には、本発明は、抗原を固相に被覆、ブロッキングおよび／または固定する工程の間に還元剤が固相に添加される上記イムノアッセイの製造方法に関する。

また本発明は、固相の前処理工程の間に還元剤が添加される上記イムノアッセイを実行する方法に関する。

#### 【0026】

被覆条件は当業者に知られているように広範であり、固相に蛋白を適用し、反応を起こさせて蛋白を固相に結合させることを包含する。結合は、共有結合、疎水結合またはイオン結合、ファンデルワールス力または水素結合であってよいが、これらに限らない。当業者に知られた別のバッファーをこの工程に使用してもよく、カルバメートおよびホスフェートバッファーがあるが、これらに限らない。

当該分野知られている方法によりブロッキングを行うことができ、例えば、アルブミン、血清蛋白、ポリビニルピロリドン (P V P)、界面活性剤、ゼラチン、ポリビニルアルコール (P V A) またはカゼインを用いて行ってもよい。

当該分野において知られた方法により固定を行う。

ブロッキング、固定および被覆条件のさらなる例を実施例セクションに示す。

#### 【0027】

さらに詳細には、本発明は、抗原を固相に被覆する工程の間に還元剤が固相に添加される上記方法に関する。被覆バッファーの例を実施例セクションに示す。知られている他のすべての被覆バッファーも本開示の一部を形成する。

#### 【0028】

また本発明は、固相をブロックする工程の間に還元剤が固相に添加される上記

方法にも関し、固相は還元剤の存在下または不存在下でそれに適用された抗原を含む。ブロッキングバッファーの例を実施例セクションに示す。知られている他のすべてのブロッキングバッファーも本開示の一部を形成する。

#### 【0029】

また本発明は、被覆抗原を固相に固定する工程の間に還元剤が固相に添加される上記方法にも関し、固相は還元剤の存在下または不存在下でそれに適用された抗原を含む。固定工程の前に、還元剤の存在下または不存在下でのブロッキング工程を行ってもよい。固定バッファーの例を実施例セクションに示す。知られている他のすべての固定バッファーも本開示の一部を形成する。

#### 【0030】

また本発明は、試料添加前における固相の前処理工程の間に還元剤が添加される上記方法に関する。被覆、ブロッキングおよび／または固定工程において還元剤で処理されたプレートに関して、あるいは前以て還元剤で処理されていないプレートに関してプレートの前処理を行うことができる。

#### 【0031】

結局、酵素イムノアッセイにおいて行われるさらなる工程の間に還元剤を添加してもよいが、可能には、被覆、ブロッキング、固定および／または前処理からなる上記4工程の1つまたはそれ以上において還元剤を適用した後に還元剤を添加する。かかるさらなる工程は抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

#### 【0032】

好みしくは、本発明は、還元剤がDTT、DTEまたはTCEPである上記方法に関する。

#### 【0033】

また本発明は、還元剤が0.1 mMないし1M、より詳細には0.5 mMないし500 mM、さらにより詳細には1 mMないし250 mM、最も詳細には1ないし50 mMの濃度範囲で使用される上記方法に関する。いくつかの適用例においては0.5ないし50 mM、1ないし30 mM、2ないし20 mM、5ないし15 mMの範囲、あるいは約10 mMの還元剤が必要となりうる。他の適用例に

においては50～500mM、100～300mMまたは200mMの濃度のDTTが必要となりうる。DTTは還元剤として特に好ましい。

#### 【0034】

また本発明は、抗原がHCV NS3蛋白である上記方法に関する。より詳細には、HCV NS3ヘリカーゼである。E1および/またはE2蛋白のごときHCVエンベロープ蛋白も好ましい。当該分野で知られた他の蛋白も、DTT存在下で固相に添加された場合、あるいは添加後DTTで処理された場合に、該蛋白に対する抗体とうまく反応する可能性がある。

#### 【0035】

また本発明は、該固相イムノアッセイが異なる病原体の抗原または表現型的に関連した条件の組み合わせを含むものである上記方法に関する。

#### 【0036】

また本発明は、上記方法により製造される固相イムノアッセイに関する、より詳細には、還元剤の存在下で抗原を含有するマイクロタイタープレート、膜片またはシリコンチップのごとき固相を少なくとも1個含むキットに関する。

より詳細には、本発明は、上記方法により製造されるELISAに関する。

#### 【0037】

好ましい具体例において、本発明は、好ましくは被覆および/または固定工程において還元剤が添加される上記方法により製造されるELISAに関する。1の好ましい具体例において、被覆工程において還元剤を適用することができる。もう1つの好ましい具体例において、固定工程において還元剤を適用することができる。特に好ましい具体例において、被覆工程および固定工程の両方において還元剤が添加される。

もう1つの好ましい具体例において、本発明は、試料添加前におけるプレートの前処理の間に還元剤が添加される上記方法により製造されるELISAに関する。被覆および/または固定工程において還元剤で処理されたプレートに関して、あるいは前以て還元剤で処理されていないプレートに関してプレートの前処理を行うことができる。プレートの前処理を行うことができる。酵素イムノアッセイにおけるさらなる工程の間に還元剤を添加してもよい。かかるさらなる工程は

抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

#### 【0038】

また本発明は、上記方法により製造されるラインイムノアッセイ（LIA）にも関する。

好ましい具体例において、本発明は、好ましくはブロッキング工程および／または洗浄工程において還元剤が添加される上記方法により製造されるラインイムノアッセイ（LIA）に関する。酵素イムノアッセイを製造または実行するさらなる工程の間に還元剤を添加してもよい。かかるさらなる工程は、固定、前処理、抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

#### 【0039】

また本発明は、上記方法により製造されるクイック（QUICK）アッセイにも関する。

好ましい具体例において、本発明は、好ましくは抗原を片に被覆する工程の間に還元剤が添加される上記方法により製造されるQUICKアッセイに関する。QUICKアッセイは、スプレイにより抗原が片上に被覆される水平流れアッセイ（lateral flow assay）である。このアッセイにおいて、好ましくは還元剤をスプレイ溶液に添加する。酵素イムノアッセイの製造または実行におけるさらなる工程の間に還元剤を添加してもよい。かかるさらなる工程は、ブロッキング、固定、前処理、抗体のインキュベーション、結合抗体の検出および発色を包含するが、これらに限らない。

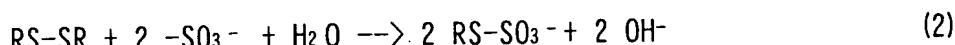
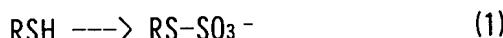
また本発明は、上記抗原に対して生成した抗体のインビトロでの診断のための上記アッセイの使用に関する。

#### 【0040】

また本発明は、スルホン化およびその後の脱スルホン化の工程を含む方法によりオリゴヌクレオチドされたHCV NS3蛋白にも関する。

スルホン化および脱スルホン化はそれぞれ蛋白に-SO<sub>3</sub>基を導入または蛋白から除去する反応である。

スルホン化は、下記反応に従って蛋白 (R) 上のチオール基 (S H) およびジスルフィド基を S-スルホネートに変換するプロセスであると定義される。



反応生成物は S-スルホ蛋白であり、通常には中性 pHにおいて安定である。pH > 7において蛋白溶液をテトラチオネートとともにインキュベーションすることにより反応 (1) を行うことができる (Inglis and Liu, 1970)。銅イオン存在下で反応 (2) を完了させる (Cole, 1967)。Chan (1968) は、酸素の存在下における亜硫酸ナトリウムおよび触媒量のシステインでの蛋白の処理によりスルホ蛋白が得られることを示した。

(1) 過剰の競合-SH (チオール) 基により、(2) 還元剤により、あるいは (3) 非中性 pH 条件におけるインキュベーションにより、脱スルホン化を行うことができる。



低分子量化合物または蛋白性-SH 基から競合チオール基を得てもよい。

モノーまたはジチオール含有化合物の例は：

システイン、システアミン、還元されたグルタチオン、N-アセチルシステイン、ホモシステイン、β-メルカプトエタノール、チオカルバメート類、ビス (2-メルカプトエチル) スルホン (BMS) および N, N'-ビス (メルカプトアセチル) ヒドラジン (BMH)、5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) (DTNB または Ellman 試葉)、ジチオスレイトール (DTT) およびジチオエリスリトール (DTE) である。

#### 【0041】

さらに本発明は、両性イオン性界面活性剤でさらに処理された上記 HCV N S 3 蛋白に関する。エムピゲン (Empigen) はベタインとして知られ、両性イオン性界面活性剤の特に好ましい例である。他の適当な界面活性剤は当業者に知られており、WO 96/04385 にも説明されている。

#### 【0042】

さらに本発明は、少なくとも2つ、好ましくは3つまたは4つ、さらに好ましくはすべての下記工程：

- (a) 組み換え宿主細胞からの溶解物をスルホン化すること、あるいは塩化グアニジウム（好ましくは、6M Gu. HC1）の存在下で組み換え宿主細胞を溶解させて細胞溶解物をスルホン化すること、
- (b) 好ましくは細胞残渣を除去した後に、両性イオン性界面活性剤で処理すること、
- (c) スルホン化組み換え蛋白を精製すること、あるいはスルホン化組み換え蛋白を精製し、その後両性イオン性界面活性剤を除去すること、ここに好ましくは、精製はクロマトグラフィー、より好ましくはNi-IMACクロマトグラフィーであり、組み換え蛋白はHis-タグを付した組み換え蛋白である、
- (d) 好ましくはモル過剰のDTTのごとき還元剤でスルホン化組み換え蛋白を脱スルホン化すること、
- (e) モル過剰のDTTの存在下で貯蔵すること

を含む、システイン含有組み換え発現蛋白の精製方法に関する。

エムピゲンは両性イオン性界面活性剤の特に好ましい例である。かかる両性イオン性界面活性剤およびDTTを用いることは、HCV NS3ヘリカーゼおよびHCVエンベロープ蛋白の精製プロトコールを改良するものである。

#### 【0043】

また本発明は、図1（配列番号：3～18）に示すHCV NS3ポリ蛋白（polyprotein）をコードするHCVポリ核酸（polynucleic acid）、または図2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1および8-1（配列番号：19、21、23、25、27、29および31）に示す配列を有するHCVポリ核酸に関する。

また本発明は、図2-1、3-1、4-1、5-1、6-1、7-1および8-1において特徴づけられ、さらにその産物が疑陽性HCV試料と反応しない事実により特徴づけられる上記HCVポリ核酸、あるいは疑陽性HCV試料と反応しないNS3エピトープをコードする該ポリ核酸の部分にも関する。配列番号：19、21、23、25、27、29および31により示されるクローンによつ

てコードされる蛋白は疑陽性HCV試料と反応しないという特性を有するが、D TT処理後、それらは大部分の既知NS3抗体陽性試料と反応し得た。

【0044】

さらに本発明は、説明したポリ核酸を含む組み換えベクターに関する。

さらに本発明は、本発明のベクターを含む宿主細胞に関する。

【0045】

さらに本発明は、本発明の核酸の検出方法に関する。この検出方法は、MaertensおよびStuyverに付与されたWO96/13590に記載のごとき当該分野で知られたいずれの方法であってもよい。

より詳細には、本発明は、

本発明の核酸をプローブと接触させ；

該核酸と該プローブとの間に形成された複合体を調べること

を含む、本発明の核酸の検出方法に関する。

したがって、本発明は、プローブもしくはプライマーとして使用される上記単離核酸またはそのフラグメントに関する。

【0046】

さらに本発明は、本発明の少なくとも1つのプライマーおよび／または少なくとも1つのプローブを含む、上記核酸配列を検出するための診断キットに関する。これらの適用を見渡すための詳細な説明についてはWO96/13590を参考のこと。

【0047】

還元により得られる反応性のほかに、NS3の反応性はNS3抗原の配列によっても重大に決定される。

それゆえ、本発明は、図1、2-2、3-2、4-2、5-2、6-2、7-2および8-2（配列番号：20、22、24、26、28、30、32）に示すアミノ酸配列の部分または全体を有するHCVポリペプチドにも関する。また本発明は、図1（配列番号：1～18）に示すHCV NS3ヘリカーゼ蛋白またはそのユニークな部分にも関する。

また本発明は、S1200、A1218、A1384、P1407、V141

2、P1424もしくはF1444のいずれか、またはこれらのアミノ酸とL1201、S1222、I1274、S1289、T1321、A1323、T1369、L1382、V1408、A1409もしくはF1410のいずれかとの組み合わせを含むHCV NS3ヘリカーゼ蛋白またはHCV NS3ヘリカーゼ蛋白の部分にも関する。上記番号付けは広く受け入れられているHCVアミノ酸の番号付けシステムによるものである。

#### 【0048】

さらに本発明は、本発明のポリペプチドまたはその機能的同等物もしくはフラグメントを含む医薬組成物に関する。用語「医薬組成物」は、本発明のポリペプチドおよび医薬上許容される担体もしくは賦形剤（両方の用語を混用することができる）を含む組成物または医薬（両方の用語を混用することができる）に関する。この医薬組成物を医薬として使用することができる。この医薬組成物をHCV感染の治療または予防のための医薬として使用することができる。当業者に知られた適当な担体または賦形剤はセイライン、リングル液、ブドウ糖液、Hankの溶液、固定油脂（fixed oils）、オレイン酸エチル、セイライン中5%ブドウ糖、等張性および化学的安定性を高める物質、バッファーならびに保存料である。他の適当な担体は、それ自体組成物を与えられる個体に有害な抗体の產生を誘導しない担体を包含し、例えば、蛋白、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸およびアミノ酸コポリマーのごときものである。当業者の知識内の適当な方法により「医薬組成物」または「医薬」を投与することができる。好みの投与経路は非経口経路またはワクチンである。非経口投与またはワクチン投与において、本発明の医薬を、上記の医薬上許容される賦形剤と混合された溶液、懸濁液またはエマルジョンのごとき1回分の注射可能形態として処方する。例えば、ワクチンとして適用するため、あるいはポリクローナル抗血清／抗体を生じさせるためには、有効量は種、年齢、および個体の一般的な状態、治療すべき症状の重さ、選択される個々のポリペプチドならびに投与方法等により様々である。比較的広範囲かつクリティカルでない範囲にわたって有効量が見出されると考えられる。ルーチンな実験のみにより適切な有効量を容易に決定することができる。HCV疾患の予防のためのNS3および／またはE1および／またはE2

および／またはE 1／E 2单量体またはオリゴマーエンベロープ蛋白の好ましい範囲は0. 01ないし1000 μg／回、好ましくは0. 1ないし100 μg／回、より好ましくは1ないし50 μg／回である。十分な免疫応答およびその後のHCVに対する防御を得るために1個体につき数回の投与が必要になるかもしれない。治療的ワクチンの場合、必要な投与回数は10回以上であるかもしれない。連続的輸液を用いてもよい。その場合、5ないし20 μg／kg／分、より好ましくは7ないし15 μg／kg／分の量で医薬を輸液してもよい。本発明の医薬組成物は、配列番号：3～18、20、22、24、26、28、30、32に示される配列の機能的に同等な変種またはフラグメントを含んでいてよい。変種またはフラグメントは、本発明のポリペプチドの蛋白配列全体あるいは本発明のポリペプチドの蛋白配列の一部を含む分子であって、ある種の修飾が付されており、本発明のポリペプチドの生物学的特性のすべてまたは一部を保持している分子をいう。かかる修飾は、多糖鎖の付加、ある種の化学基の付加、脂質部分の付加、他のペプチドまたは蛋白配列との融合ならびに分子内架橋の形成を包含するが、これらに限らない。

#### 【0049】

また本発明は上記HCVポリペプチドを含むイムノアッセイにも関する。該イムノアッセイは当該分野で知られたいずれのフォーマットのタイプであってもよい（例えば、WO96/13590およびColigan et al. 1992参照）。詳細には、本発明は、本発明のポリペプチドを検出する方法に関し、該方法は、

該ポリペプチドを該ポリペプチドに結合するリガンドと接触させ；

該ポリペプチドと該リガントとの間に形成された複合体を調べることを含む。

また本発明は、本発明のポリペプチドに結合するリガンドにも関する。用語「リガンド」は、本発明のポリペプチドに結合しうる分子をいう。リガンドは、特に、本発明のポリペプチドに対して特異的に生成した（当該分野において知られた方法により）ポリクローナルおよび／またはモノクローナル抗体をいい、さらに抗体様構築物およびLorre et al. に付与されたEP9780062.0に詳述された他の構築物も包含する。かかる抗体は生物学的液体中の抗原の検出に非常

に有用である可能性がある。ビオチンおよびアビシンまたはストレプトアビシンを用いるアッセイ、ELISAおよび免疫沈降、免疫組織化学的手法および凝集アッセイのごとき当該分野で知られたイムノアッセイにより抗原の検出を行うことができる。これらのアッセイに関する詳細な説明はWO96/13590にあり、参照により本明細書に一体化させる。

#### 【0050】

さらにそのうえ、該抗体はHCVまたは他の疾病の治療に非常に有用である可能性があり、それゆえ、非ヒト宿主において生成される場合にはヒト化されてもよい。したがって、本発明は、医薬上許容される賦形剤中のこれらの抗体を含む、医薬として使用される組成物に関する。

また本発明は、本発明の該抗体を製造し使用する方法にも関する。HCVポリペプチドの製造および使用方法はWO96/13590に開示されている。該使用は診断における使用のみならず治療的および予防的使用も包含する。本発明のNS3蛋白はワクチン組成物中に含有させるのにも適する。かかるワクチン組成物は、有効成分のほかに、当該分野で知られたいずれかのタイプのアジュvantを含んでいてもよい。WO96/13590の内容を参照により本明細書の説明に取り入れる。本発明のNS3蛋白は、薬剤スクリーニング目的のようNS3ヘリカーゼが適用可能ないずれの適用例にも使用することできる。

#### 【0051】

##### 実施例

実施例1 HCV NS3タイプ1bクローン19bのイー・コリ (E. coli) における発現

1. 1 HCV NS3タイプ1bクローン19aおよび19b遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマーHCP r 59 (5'-GGGCCCCACCATGGGGTTGC GAAGGCCGTGGACTT-3') (配列番号: 1) およびHCP r 60 (5'-CTATTAGCTGAAA GTCGACTGTCTGGGTGACAGCA-3') (配列番号: 2) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸1188~1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ1b血清IG8309 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これに

よりPCRフラグメント19を得て、イー・コリ中にクローン化した。センスプライマーHCP r 59は、人工的なメチオニンを含むApa I制限部位を導入する。アンチセンスオリゴヌクレオチドHCP r 60はaa (アミノ酸) 1465の後ろに停止コドンを導入する。次いで、PCRフラグメントをApa Iで切断し、得られた833bpのApa IフラグメントをApa Iで切断した発現ベクターpMTNFHRP (Innogenetics, Ghent, Belgium) 中に組み込んだ。4つのC型肝炎クローン (HCC 1) を配列決定した: HCC 119aおよびHCC 119b (図1および図2-2に示す推定アミノ酸配列参照)。クローンHCC 119b (pMTNFHRPHCC 119b) をさらなるサブクローニングのために保存した。

### 【0052】

#### 1. 2 発現プラスミドpEmTNFMPHHCC 119bの構築

ベクターpMTNFHRPHCC 119bから出発して、NS3クローン19bコーディング配列を900bpのNco Iフラグメントとして単離し、Nco Iで切断した発現ベクターpEmTNFMPH (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクターpEmTNFMPHHCC 119bを得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3クローン19bを発現する (配列番号: 19および20; 図2)。

### 【0053】

#### 1. 3 イー・コリにおけるHCV NS3クローン19bの発現

イー・コリ株MC 1061 (pAc I) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミドpEmTNFMPHHCC 119bで形質転換した。pEmTNFMPH HCC 119bを有するMC 1061 (pAc I) 細胞を、10 μg/mlのテトラサイクリンを補足したLuria Broth (LB) 中、28°Cにおいて一晩増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28°Cで増殖させてOD<sub>600</sub>を0.2とし、その後、温度を42°Cまで上昇させた。誘導から2~3時間後に細胞を集めた。HCV NS3クローン19b融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングに

より分析した。

【0054】

実施例2 イー・コリにおけるHCV NS3クローンB9の発現

2. 1 HCV タイプ1aクローンB9遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマーHCP r 59 (5'-GGGCCCCACCATGGGGTTGC GAAGGCGGTGGACTT-3') (配列番号: 1) およびHCP r 60 (5'-CTATTAGCTGAAA GTCGACTGTCTGGGTGACAGCA-3') (配列番号: 2) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸1188~1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ1a血清IG21054 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これによりPCRフラグメントBを得て、イー・コリ中にクローン化した。センスプライマーHCP r 59は、人工的なメチオニンを含むApal制限部位を導入する。アンチセンスオリゴヌクレオチドHCP r 60はaa1465の後ろに停止コドンを導入する。次いで、PCRフラグメントをpGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI, US) 中に組み込んだ。4つのC型肝炎クローンを配列決定した: B7、B9、B12およびB14 (図1および図3-2に示す推定アミノ酸配列参照)。クローンB9 (pGEMTNS3B9) をさらなるサブクローニングのために保存した。

【0055】

2. 2 発現プラスミドpIGFH111NS3B9の構築

ベクターpGEMTNS3B9から出発して、B9コーディング配列を850 bpのNco I/Sst Iフラグメントとして単離し、Nco I/Sst Iで切断した発現ベクターpIGFH111 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクターpIGFH111NS3B9を得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3クローンB9を発現する (配列番号: 21および22; 図3)。

【0056】

2. 3 イー・コリにおけるHCV NS3クローンB9の発現

イー・コリ株MC1061 (pAC1) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラ

スミド p I G F H 1 1 1 N S 3 B 9 で形質転換した。p I G F H 1 1 1 N S 3 B 9 を有する M C 1 0 6 1 (p A c I) 細胞を、10 μg/ml のテトラサイクリンを補足した Luria Broth (L B) 中、28°Cにおいて一晩増殖させた。培養物を新鮮 L B で 20 倍に希釈し、次いで、28°Cで増殖させて OD<sub>600</sub> を 0.2 とし、その後、温度を 42°Cまで上昇させた。誘導から 2~3 時間後に細胞を集めた。HCV N S 3 クローン B 9 融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体および HCV 陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

#### 【0057】

実施例3 イー・コリにおける HCV N S 3 タイプ 1 a クローン A 2 6、C 1 6 および D 1 8 の発現

プライマー H C P r 5 9 および H C P r 6 0 を用いる クローン B 9 の単離に関して説明したのと同様にして、クローン A 2 6、C 1 6 および D 1 8 を、それぞれ、HCV サブタイプ 1 a 感染血清 I G 2 1 0 5 1、I G 1 7 7 9 0 および I G 2 1 0 6 8 から単離した。最初に、クローン A 5、A 2 6、C 1、C 3、C 4、C 1 2、C 1 6、D 1 7、D 1 8 および D 1 9 をクローン化し、次いで、配列決定した (図 1 に示す推定アミノ酸配列参照)。クローン A 2 6、C 1 6 および D 1 8 をさらなるサブクローンのために保存した。

#### 【0058】

実施例4 イー・コリにおける HCV N S 3 タイプ 3 a クローン 2 1 および 3 2 の発現

4. 1 HCV N S 3 タイプ 3 a クローン 2 1 および 3 2 遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー 4 0 3 (5' GGGCCCCACCATAGGTGTAGCAAAAGCC CTACAGTT-3') (配列番号: 3 3) および 4 0 4 (5'-CTATTAGCTGAAGTCAACGTACTG TTCAACAGC-3') (配列番号: 3 4) を用いて、N S 3 ヘリカーゼドメイン (アミノ酸 1 1 8 8 ~ 1 4 6 5) を R T - P C R により HCV サブタイプ 3 a 血清 I G 2 1 3 4 9 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、いずれの場合にも約 850 bp の P C R フラグメントが得られ、次いで、p G E M - T ベクター (Promega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。クローン化さ

れた各PCRフラグメントから、数個のクローンを配列決定したが、配列決定により、各血清由来のただ1個のクローン化フラグメントだけが完全に正しいものであることがわかった。これらは血清IG21349に関してはクローン31（pGEM-TNS3T3a. 21）であり、血清IG20014に関してはクローン32（pGEM-TNS3T3a. 32）であった（図4および5）。

#### 【0059】

4. 2 発現プラスミドpIGFH111NS3T3a. 21およびpIGFH111NS3T3a. 32の構築

ベクターpGEM-TNS3T3a. 21およびpGEM-TNS3T3a. 32から出発して、クローン21および32コーディング配列を850bpのNcoI/SalIフラグメントとして単離し、NcoI/SalIで切断した発現ベクターpIGFH111（Innogenetics, Ghent, Belgium）に挿入し、それぞれベクターpIGFH111NS3T3a. 21およびpIGFH111NS3T3a. 32を得た。これらのプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3タイプ3aクローン21および32を発現する（配列番号：23～26；図4および5）。

#### 【0060】

4. 3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ3aクローン21および32の発現

イー・コリ株MC1061（pAcI）細胞（Wertman et al., 1986）をプラスミドpIGFH111NS3T3a. 21およびpIGFH111NS3T3a. 32でそれぞれ形質転換した。pIGFH111NS3T3a. 21またはpIGFH111NS3T3a. 32を有するMC1061（pAcI）細胞を、10μg/mlのテトラサイクリンを補足したLuria Broth（LB）中、28℃において一晩増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釀し、次いで、28℃で増殖させてOD<sub>600</sub>を0.2とし、その後、温度を42℃まで上昇させた。誘導から2～3時間後に細胞を集め、HCV NS3タイプ3aクローン21および32融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト

血清を用いるウェスタンプロットティングにより分析した。

### 【0061】

実施例5 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2aクローン3の発現

#### 5. 1 HCV NS3タイプ2aクローン3遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー412 (5'-GGGCCCCACCATGGCGTGGCCAAGTC  
CATAGACTT-3') (配列番号: 35) および413 (5'-CTATTAGCTGAAGTCTACAACTT  
GAGTGACCGC-3') (配列番号: 36) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (ア  
ミノ酸1188~1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ2a血清I  
G21342 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、約  
850bpのPCRフラグメントが得られ、次いで、pGEM-Tベクター (Pr  
omega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。数個のクローンを配列決定し  
、クローン3 (pGEM-TNS3T2a) をさらなるサブクローニングのため  
に保存した (図6)。

### 【0062】

#### 5. 2 発現プラスミドpIGFH111NS3T2aの構築

ベクターpGEM-TNS3T2aから出発して、クローン3コーディング配  
列を850bpのNcoIフラグメントとして単離し、NcoIで切断した発現  
ベクターpIGFH111 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクタ  
ーpIGFH111NS3T2aを得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン  
精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融  
合蛋白としてHCV NS3タイプ2aクローン3を発現する (配列番号: 27  
および28; 図6)。

### 【0063】

#### 5. 3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2aクローン3の発現

イー・コリ株MC1061 (pAcI) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラ  
スミドpIGFH111NS3T2aで形質転換した。pIGFH111NS3  
T2aを有するMC1061 (pAcI) 細胞を、10μg/mlのテトラサイ  
クリンを補足したLuria Broth (LB) 中、28℃において一晩増殖させた。培  
養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28℃で増殖させてOD<sub>600</sub>を0.

2とし、その後、温度を42℃まで上昇させた。誘導から2~3時間後に細胞を集めた。HCV NS3タイプ2aクローン3融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

#### 【0064】

実施例6 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2bクローン9の発現

##### 6. 1 HCV NS3タイプ2bクローン9遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー401 (5'-GGGCCCCACCATGGCGTAGCCAAATC CATTGACTT-3') (配列番号: 37) および402 (5'-CTATTAGCTGAAGTCTACAATTG GAGAGACCGC-3') (配列番号: 38) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸1188~1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ2b血清I G20192 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、約850bpのPCRフラグメントが得られ、pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。数個のクローンを配列決定し、クローン9をさらなるサブクローニングのために保存した (図7)。

#### 【0065】

##### 6. 2 発現プラスミドpIGFH111NS3T2bの構築

ベクターpGEM-TNS3T2bから出発して、クローン9コーディング配列を850bpのNcoIフラグメントとして単離し、NcoIで切断した発現ベクターpIGFH111 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクターpIGFH111NS3T2bを得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3タイプ2bクローン9を発現する (配列番号: 29~30; 図7)。

#### 【0066】

##### 6. 3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2bクローン9の発現

イー・コリ株MC1061 (pAcI) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミドpIGFH111NS3T2bで形質転換した。pIGFH111NS3T2bを有するMC1061 (pAcI) 細胞を、10μg/mlのテトラサイ

クリンを補足したLuria Broth (LB) 中、28℃において一晩増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28℃で増殖させてOD<sub>600</sub>を0.2とし、その後、温度を42℃まで上昇させた。誘導から2～3時間後に細胞を集め、HCV NS3タイプ2bクローン9融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

#### 【0067】

実施例7 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2cクローン14の発現

##### 7. 1 HCV NS3タイプ2cクローン14遺伝子のクローニング

合成オリゴヌクレオチドプライマー401 (5'-GGGCCCCACCATGGCGTAGCCAAATC CATTGACTT-3') (配列番号: 37) および402 (5'-CTATTAGCTGAAGTCTACAATT GAGAGACCGC-3') (配列番号: 38) を用いて、NS3ヘリカーゼドメイン (アミノ酸1188～1465) をRT-PCRによりHCVサブタイプ2c血清IG20031 (Innogenetics, Ghent, Belgium) から増幅した。これにより、約850bpのPCRフラグメントが得られ、pGEM-Tベクター (Promega, Madison, WI, US) 中にサブクローンした。数個のクローンを配列決定し、クローン14 (pGEM-TNS3T2c) をさらなるサブクローニングのために保存した (図8)。

#### 【0068】

##### 7. 2 発現プラスミドpIGFH111NS3T2cの構築

ベクターpGEM-TNS3T2cから出発して、クローン14コーディング配列を850bpのNcoIフラグメントとして単離し、NcoIで切断した発現ベクターpIGFH111 (Innogenetics, Ghent, Belgium) に挿入し、ベクターpIGFH111NS3T2cを得た。このプラスミドは、ヘキサヒスチジン精製タグおよびギ酸開裂部位が後に続くネズミTNFのN末端の25aaとの融合蛋白としてHCV NS3タイプ2cクローン14を発現する (配列番号: 31および32; 図8)。

#### 【0069】

##### 7. 3 イー・コリにおけるHCV NS3タイプ2cクローン14の発現

イー・コリ株MC1061 (pAcI) 細胞 (Wertman et al., 1986) をプラスミドpIGFH111NS3T2cで形質転換した。pIGFH111NS3T2cを有するMC1061 (pAcI) 細胞を、10 μg/mlのテトラサイクリンを補足したLuria Broth (LB) 中、28℃において一晩増殖させた。培養物を新鮮LBで20倍に希釈し、次いで、28℃で増殖させてOD<sub>600</sub>を0.2とし、その後、温度を42℃まで上昇させた。誘導から2~3時間後に細胞を集め、HCV NS3タイプ2cクローン14融合蛋白の発現を、特異的モノクローナル抗体およびHCV陽性ヒト血清を用いるウェスタンブロッティングにより分析した。

#### 【0070】

実施例8 9体積の8M塩酸グアニジニウム (Gu. HC1) および1体積の0.2M NaHPO<sub>4</sub>を各グラム当量の湿イー・コリ細胞ペーストに添加し、連続的にボルテックスすることにより溶液を均質化させた。固体Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub>およびNa<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>を溶液に添加して、それぞれの最終濃度を6.5mMおよび3.60mMとした。CuSO<sub>4</sub> (ストック溶液: 25% NH<sub>3</sub>中0.1M) を添加して最終濃度100 μMとした。暗所かつ室温において溶液を一晩攪拌し、-70℃でインキュベーションした後、4℃で遠心分離 (20000 rpmで30分、JA20ローター) することにより清澄化させた。

エムピゲンBB™ (Albright & Wilson Ltd., Okibury, UK) およびイミダゾールを上清に添加して最終濃度をそれぞれ1% (w/v) および2.0mMとした。1N HC1を用いてpHを7.2に合わせた。3Lの細胞培養物に相当する試料を、2.0mMイミダゾールを含有するバッファーAで平衡化しておいた2.5mLのNi-IDA Sepharose FF (XK 16/20 カラム, Pharmacia, Uppsala, Sweden) に2mL/分で負荷した (バッファーA: 5.0mMホスフェート、6M Gu. HC1、1%エムピゲン、pH 7.2)。Ni-IDA Sepharoseカラムを下記バッファーで順次洗浄した:

2.0mMイミダゾール含有バッファーA

3.5mMイミダゾール含有バッファーA

5.0mMイミダゾール含有バッファーA

50 mMイミダゾール含有バッファーB (バッファーB: 50 mMホスフェート、6 M Gu. HCl、pH 7.2)

200 mMイミダゾール含有バッファーB。

280 nmにおける吸光度がベースラインに達するまでクロマトグラフィーにおいて各洗浄を行った。50 mM EDTA、500 mM NaCl、pH 7.0 でカラムを再生した。

非還元的条件および銀染色を用いるSDS-PAGEによりフラクションを分析した。mTNF-NS3 B9融合蛋白を200 mMイミダゾールでの溶出物中に回収した。ウサギ抗ヒトTNF (1 μg NS3/レーン) およびウサギ抗イー・コリ (10 μg NS3/レーン) を用いるウェスタンプロッティングにより、この単一クロマトグラフィー工程後におNS3純度が99%以上であることが示された。

200 mMイミダゾール溶出フラクションをプールし、脱塩した。

40 mLのNi-IDA溶出試料を、50 mMホスフェート、6 M尿素、1 mM EDTA、pH 7.2で平衡化しておいた300 mLのSephadex G-25カラム (XK 50, Pharmacia, Uppsala, Sweden) に10 mL/分で負荷した。10 mLのフラクションを集め、ミクロBCA法 (Pierce, Rockford, IL, US) により蛋白濃度を調べた。脱塩バッファーを用いて蛋白濃度を500 μg/mLに合わせ、次いで、脱スルホン化および還元を行った。全工程にわたる収量は、1 Lの培養物あたり50～55 mgの精製NS3融合蛋白であった。

最後に、DTT (ストック溶液: 蒸留水中100 mM) を、NS3抗原中のシステイン含量 (例えば、NS3 19bは7個のシステインを含む) に対して100倍モル過剰添加した。溶液に窒素を吹き込み、28°Cで1時間インキュベーションした。次いで、ELISAおよびLIA被覆用にNS3試料を適当なバッファーで希釈した。

### 【0071】

実施例9 LIAにおいて試験したNS3ヘリカーゼ抗体の反応性

NS3ヘリカーゼ抗体の反応性を調べるために、ホスフェート緩衝化セイライン中の50 μg/mL NS3抗原溶液をナイロン膜片上に適用した。18～2

4℃において少なくとも1時間片を乾燥させ、次いで、還元剤DTTの存在下（10mM）または不存在下でPBS／カゼインでブロックした。次いで、DTT不含または10mM DTT含有するTween 20含有PBSで、次いで、DTT不含または10mM DTT含有する1mM EDTA含有水で片を洗浄した。膜を30分乾燥させ、異なる患者の試料を調べるために片状に切断した。

抗HCVセロコンバージョンパネルPHV903 (Boston Biomedica Inc., Boston, US) とともに片をインキュベーションした実験結果を表1に示す。

#### 【0072】

実施例10 ELISAにおいて試験したNS3ヘリカーゼ抗体の反応性

NS3ヘリカーゼ抗体の反応性を調べるために、実施例4のごとく精製したNS3抗原でELISAプレートを次のように被覆した。

マイクロタイタープレートのウェルを、200mM DTT含有またはDTT不含の1mM EDTA含有50mM炭酸バッファーを含有する被覆バッファー中、濃度0.3μg/mlのNS3蛋白で被覆した。マイクロタイタープレートを20℃で18時間インキュベーションし、1ウェルあたり300μlのPBS／カゼインバッファーでブロックした。プレートを20℃で2時間インキュベーションし、次いで、200mM DTT含有またはDTT不含の1mM EDTA含有固定バッファー300μlで、20℃で2時間固定した。

結果を表2および3に示す。表2は、NS3で被覆し、DTTありまたはなしで固定したアッセイをBBIセロコンバージョンパネルPHV901およびPHV902に適用した場合のノイズ対シグナル値を示す。表3は、DTTを用いるアッセイによりHCV抗体をより早く検出できる日数をまとめたものである。明らかに、アッセイにDTTを用いることによって、12のHCVセロコンバージョンにおけるより早い検出の全日数34を得ることができる。

#### 【0073】

【表1】

表1 実施例9で説明したHCV NS3で被覆したLIAにおいて  
試験したBBIパネル

PHV	+DTT <sup>1</sup>	-DTT <sup>1</sup>
903-01	-	-
903-02	-	-
903-03	+/-	-
903-04	2	-
903-05	2	+/-
903-06	2	+/-
903-07	4	2
903-08	4	2

<sup>1</sup>-: 反応せず； +反応陽性； 同じ片上にスプレイされた異なるカットオフ線との  
比較において強度等級を示す。

【表2】

表2 実施例10において説明したHCV NS3で被覆したELISAにおいて  
試験したBBIパネル

メンバーID番号	採血日	+ DTT (OD <sub>450</sub> )	- DTT (OD <sub>450</sub> )
PHV901-01	09/23/93	0.1	0.3
PHV901-02	11/27/93	0.1	0.3
PHV901-03	12/29/93	2.0	2.9
PHV901-04	12/31/93	2.1	3.0
PHV901-05	01/05/94	2.2	3.1
PHV901-06	01/07/94	2.4	3.2
PHV901-07	02/01/94	4.1	6.0
PHV901-08	02/09/94	3.9	5.9
PHV901-09	03/01/94	4.0	7.9
PHV901-10	03/08/94	4.1	7.8
PHV901-11	04/14/94	4.2	8.3
PHV903-01	02/07/92	0.2	0.2
PHV903-02	02/12/92	0.9	0.9
PHV903-03	02/14/92	1.3	1.6
PHV903-04	02/19/92	2.5	2.7
PHV903-05	02/21/92	2.8	2.8
PHV903-06	02/26/92	3.2	4.6
PHV903-07	02/28/92	3.5	5.4
PHV903-08	03/04/92	3.5	4.1
PHV904-01	04/18/95	0.1	0.2
PHV904-02	04/20/95	0.1	0.3
PHV904-03	04/25/95	0.1	0.2
PHV904-04	04/27/95	0.1	0.2
PHV904-05	05/02/95	0.4	0.4
PHV904-06	05/09/95	0.8	0.5
PHV904-07	05/11/95	0.8	0.5
PHV905-01	11/17/95	0.1	0.2
PHV905-02	11/21/95	0.1	0.3
PHV905-03	11/24/95	0.1	0.3
PHV905-04	11/28/95	0.2	0.3
PHV905-05	12/01/95	0.5	0.3
PHV905-06	12/05/95	1.0	0.4
PHV905-07	12/08/95	2.5	0.8
PHV905-08	12/12/95	3.5	2.2
PHV905-09	12/15/95	3.5	3.2

【表3】

表2のつづき

メンバーID番号	採血日	+ DTT	- DTT
PHV907-01	04/06/96	0.1	0.2
PHV907-02	04/10/96	0.1	0.2
PHV907-03	04/13/96	0.1	0.2
PHV907-04	04/19/96	3.0	2.2
PHV907-05	04/24/96	3.7	4.1
PHV907-06	04/27/96	3.6	4.1
PHV907-07	09/17/96	3.9	7.6
PHV908-01	01/26/96	0.1	0.1
PHV908-02	01/29/96	0.1	0.1
PHV908-03	01/31/96	0.1	0.1
PHV908-04	02/06/96	0.1	0.1
PHV908-05	02/08/96	0.1	0.1
PHV908-06	02/14/96	0.2	0.1
PHV908-07	02/20/96	1.4	0.2
PHV908-08	02/22/96	1.6	0.2
PHV908-09	02/27/96	1.9	0.2
PHV908-10	03/01/96	2.3	0.2
PHV908-11	03/07/96	2.3	0.4
PHV908-12	03/11/96	2.8	0.5
PHV908-13	03/14/96	2.8	0.5
PHV909-01	01/28/96	0.1	0.4
PHV909-02	02/15/96	2.3	5.4
PHV909-03	02/17/96	2.4	5.3
PHV910-01	08/26/96	0.1	0.2
PHV910-02	08/30/96	0.4	0.2
PHV910-03	09/03/96	2.7	3.1
PHV910-04	09/06/96	3.6	6.4
PHV910-05	09/10/96	3.9	8.1
PHV911-01	10/30/96	0.1	0.2
PHV911-02	11/02/96	0.1	0.2
PHV911-03	11/13/96	2.1	4.0
PHV911-04	11/20/96	3.6	7.8
PHV911-05	11/23/96	3.7	7.7
PHV912-01	01/06/96	0.2	0.3
PHV912-02	01/10/96	0.2	0.2
PHV912-03	01/13/96	4.5	9.9

【表4】

表2のつづき

メンバー ID番号	採血日	DTT	-DTT
PHV902-01	02/10/92	0.1	0.2
PHV902-02	02/12/92	0.1	0.2
PHV902-03	02/17/92	0.1	0.3
PHV902-04	02/19/92	0.3	0.6
PHV902-05	02/24/92	2.6	3.9
PHV902-06	02/26/92	3.1	5.9
PHV902-07	03/02/92	3.4	6.5
PHV906-01	10/07/95	0.5	0.3
PHV906-02	10/09/95	0.5	0.4
PHV906-03	10/14/95	1.6	0.6
PHV906-04	10/17/95	1.5	1.2
PHV906-05	10/21/95	2.2	3.0
PHV906-06	10/24/95	2.5	4.5
PHV906-07	10/28/95	2.9	5.7

【表5】

表3 BBIパネルの概観—より早く検出できる日数

PHV	+DTT	-DTT
901	0	0
902	0	0
903	0	0
904	0	0
905	7	0
906	3	0
907	0	0
908	24	0
910	0	0
911	0	0
912	0	0

【0074】

## 文献

Burns, J., Butler, J., Moran, J., and Whitesides, G. (1991) Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl) phosphine. *J. Org. Chem.* 56, 2648-2650.

Chan, W. (1968) A method for the complete S sulfonation of cysteine residues in proteins. *Biochemistry* 7, 4247-4254.

Claeys, H., Volkaerts, A., Verhaert, H., De Beenhouwer, H., and Vermeylen, C. (1992) Evaluation of anti-HCV capsid indeterminate samples. *The Lancet* 340, 249.

Cole, R. (1967) Sulfitolysis. *Meth. Enzymol.* 11, 206.

Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D., Shevach, E. and Strober, W. (1992) *Current protocols in immunology*. Wiley Interscience.

De Beenhouwer, H., Verhaert, H., Claeys, H., and Vermeylen, C. (1992) Confirmation of hepatitis C virus positive blood donors by immunoblotting and polymerase chain reaction. *Vox. Sang.* 63, 198-203.

Di Bisceglie, AM, Carithers, RL Jr, Gores, GJ (1998) Hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 28, 1161-1165.

Gailit, J. (1993) Restoring free sulphydryl groups in synthetic peptides. *Anal. Biochem.*, 214, 334-335.

Holmgren, A. (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* 254, 9627-9632.

Inglis, A., and Liu, T. (1970) The stability of cysteine and cystine during acid hydrolysis of proteins and peptides. *J. Biol. Chem.* 245, 112-116.

McFarlane, I., Smith, H., Johnson, P., Bray, G., Vergani, D., and Williams, R. (1990) Hepatitis C virus antibodies in chronic active hepatitis: pathogenic factor or false-positive result? *The Lancet* 335, 754-757.

Maertens, G. and Stuyver, L. (1997) Genotypes and Genetic variation of hepatitis C virus. In: *Molecular Medicine of Hepatitis* (Eds. Zuckerman, A. and Harrison, T.), *Molecular Medical Science Series* (Eds. James, K. and Morris A) John Wiley and Sons Ltd., Chichester, England, Chapter 13, p. 183-233.

Marin, M., Bresciani, S., Puoti, M., Rodella, A., Gussago, A., Ravaggi, A., Pizzocolo, G., Albertini, A., and Cariani, E. (1994) Clinical signif

ificance of serum HCV RNA as marker of HCV infection. *J. Clin. Microbiol.* 32, 3008-3012.

Peeters, D., Dekeyser, F., DeLeys, R., Maertens, G., and Pollet, D. (1993) Confirmation of anti-hepatitis C virus antibodies using the INNO-LIA HCV Ab III including Core, E2/NS1, NS3, NS4, and NS5 epitopes. *International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*, Tokyo, abstract 413

Pollet, D., Saman, E., Peeters, D., Warmenbol, H., Heyndricks, L., Wouters, C., Beelaert, G., van der Groen, G., and Van Heuverswyn, H. (1990) Confirmation and differentiation of antibodies to human immunodeficiency virus 1 and 2 with a strip-based assay including recombinant antigens and synthetic peptides. *Clin. Chem.* 37, 1700-1707.

Saito, I., Miyamura, T., Ohbayashi, A., Harada, H., Katayama, T., Kikuchi, S., Watanabe, Y., Koi, S., Onji, M., Ohta, Y., Choo, Q.-L., Houghton, M., and Kuo, G. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6547-6549.

Singh, R., and Kats, L. (1995) Catalysis of reduction of disulfide by selenol. *Anal. Biochem.* 232, 86-91.

Stuyver, L., Fretz, C., Esquivel, C., Boudifa, A., Jaulmes, D., Azar, N., Lunel, F., Leroux-Roels, G., Maertens, G., and Fournel, J. (1996) HCV genotype analysis in apparently healthy anti-HCV positive Parisian blood donors. *Transfusion* 36, 552-558.

Thakur, M., DeFulvio, J., Richard, M., and Park, C. (1991) Technetium-99m labeled monoclonal antibodies: evaluation of reducing agents. *Nucl. Med. Biol.*, 18, 227-233.

Waumans, L., Claeys, H., Verhaert, H., Mertens, W., and Vermylen, C. (1993) Hepatitis C virus confirmation in blood donor screening. *Vox. Sang.* 64, 145-149.

Wertman K. F., Wyman A. R. and Botstein D. (1986) Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* 49:

253-262.

Zaaijer, H., Vrielink, H., van Exel-Oehlers, P., Cuypers, H., and Lelie, P. (1994) Confirmation of hepatitis C infection: a comparison of five immunoblot assays. *Transfusion* 34, 603-607.

【図面の簡単な説明】

【図1】 HCVサブタイプ1aおよび1b感染血清から単離されたHCV NS3クローンのアミノ酸配列を示す。

【図2-1】 mTNFH6NS3クローン19b融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図2-2】 mTNFH6NS3クローン19b融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図3-1】 mTNFH6NS3クローンB9融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図3-2】 mTNFH6NS3クローンB9融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図4-1】 mTNFH6NS3タイプ3aクローン21融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図4-2】 mTNFH6NS3タイプ3aクローン21融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図5-1】 mTNFH6NS3タイプ3aクローン32融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分

を含む。

【図5-2】 mTNFH6NS3タイプ3aクローン32融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図6-1】 mTNFH6NS3タイプ2a融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図6-2】 mTNFH6NS3タイプ2a融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図7-1】 mTNFH6NS3タイプ2b融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図7-2】 mTNFH6NS3タイプ2b融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図8-1】 mTNFH6NS3タイプ2c融合蛋白のDNAコーディング配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図8-2】 mTNFH6NS3タイプ2c融合蛋白のアミノ酸配列を示す。太字で示した配列は非NS3配列である。この配列はmTNF融合パートナー、ヘキサヒスチジンタグおよびマルチリンカーの部分を含む。

【図1-1】

Figure 1 - 1

NS3A5	MGVAKAVDFIFPVENLETTMRSPVETDNSSPPAVQPSFQVAHLHAPTGSGKSTKVPAAAYAA
NS3A26	-T-V-G
NS3B7	-S-
NS3B9	-S-
NS3B12	-S-
NS3B14	-S-
NS3C1	-SM-T-
NS3C3	-SM-T-
NS3C4	-SM-T-
NS3C12	-SM-T-
NS3C16	-SM-T-
NS3D17	-D-
NS3D18	-
NS3D19	-T-
NS3HCCL19A	-V-SM-
NS3HCCL19B	-V-SM-T-

【図 1-2】

Figure 1 - 2

NS3A5	QGFKVVLNPSVATLGFCAAMSRAHGIDPNIRTGVRTITGSPITYSTYGKFLADGGCS
NS3A26	--Y-----L-----KV-----
NS3B7	--Y-----Y-----K-----
NS3B9	--Y-----Y-----K-----
NS3B12	--Y-----Y-----K-----
NS3B14	--Y-----Y-----K-----
NS3C1	--Y-----Y-----K-----
NS3C3	--Y-----Y-----K-----
NS3C4	--Y-----Y-----K-----
NS3C12	--Y-----Y-----K-----
NS3C16	--Y-----Y-----K-----
NS3D17	--Y-----Y-----K-----
NS3D18	--Y-----Y-----K-----
NS3D19	--Y-----Y-----K-----
NS3HCCL19A	--Y-----Y-----K-----
NS3HCCL19B	--Y-----Y-----K-----

【図1-3】

Figure 1 - 3

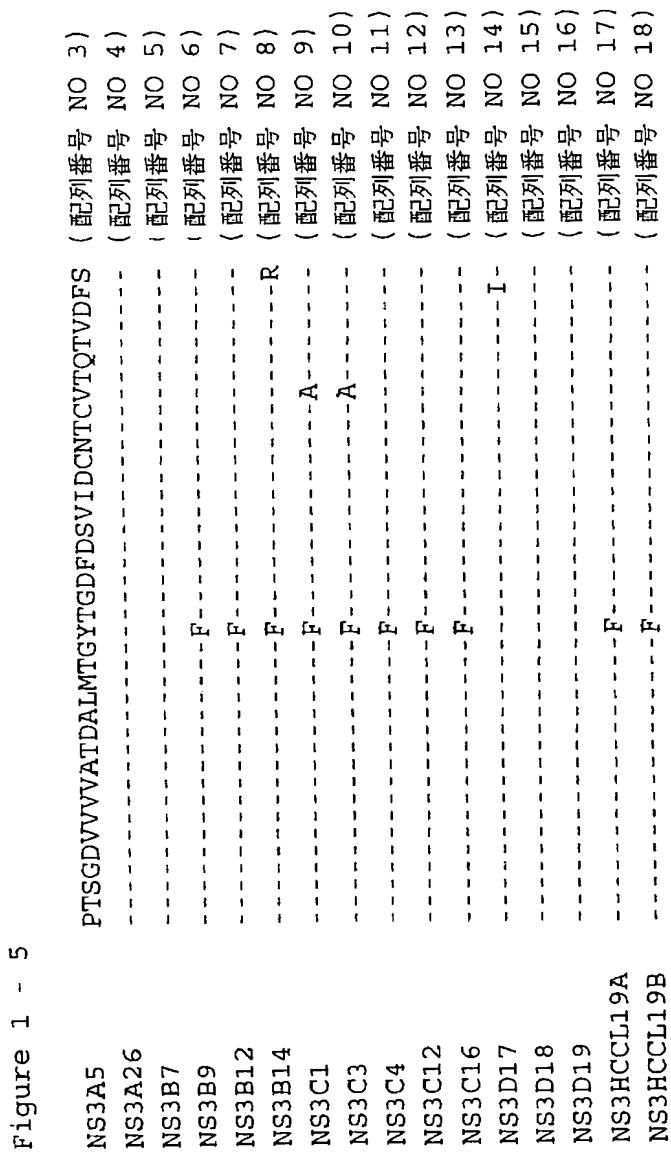
NS3A5	GGAYDIMICDECHSTDATASILGIGTVLDQAFETAGARLIVVLAATAPPGSVTVPHPNIEEVA
NS3A26	I
NS3B7	I
NS3B9	I
NS3B12	I
NS3B14	I
NS3C1	I
NS3C3	I
NS3C4	I
NS3C12	I
NS3C16	I
NS3D17	I
NS3D18	I
NS3D19	I
NS3HCL19A	I
NS3HCL19B	I

【図1-4】

Figure 1 - 4

NS3A5	LSTGEIPFFYKAIPILEAIKGGRHLIFCHSKKKCDELAALKLTALGVNAVAYYRGLDVSVI
NS3A26	R
NS3B7	C
NS3B9	PV
NS3B12	V
NS3B14	V
NS3C1	T
NS3C3	T
NS3C4	T
NS3C12	T
NS3C16	T
NS3D17	K
NS3D18	V
NS3D19	QV
NS3HCCL19A	SGV
NS3HCCL19B	SGF

【図1-5】



【図 2-1】

Figure 2-1

```

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATTGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC
CACCAAGTGGAGGAGCAGGAAATTACCATCACCATCACCAAGTGGATCCCAGGCCCAG
GGGTTGCGAAGGCGGTGGACTTGTACCGTAGAGTCTATGAAACCACCATGCGGTCC
CCGGTCTTACGGATAACTCATCTCCTCCGGCGTACCGCAGACATTCAAGTGGCCAT
CTACAGCCCCCACTGGTAGTGGCAAGAGCACTAAGGTGCCGGCTGCATATGCAGCCAA
GGGTACAAGGTACTTGTCTGAACCCATCCGTTGCCGGCACCTAGGATTCGGGGCGTAT
ATGTCTAAAGCACATGGTGTGACCCCTAACATTAGAACCTGGGTAAGGACCATCACACG
GGCGCCCCCATTACGTAACCTACGGCAAGTTCTTGCGGACGGTGGCTCTGGG
GGCGCTTACGACATCATAATATGTGATGAGTGCACACTGATTGACTCAACCTCCATCTTG
GGCATCGGCCACCGTCTGGATCAGGCGGAGACGGCTGGAGCGCGGCTTGTGCTCGCC
ACTGCTACACCTCCGGGTGGTACCGTGCCACATCCCAACATCGAGGAGGTGGCTCTG
TCCAGCACTGGAGAGATCCCCTTTATGGCAAAGCCATCCCCATCGAGGTCATCAAAGGG
GGGAGGCACCTCATTTCTGCCATTCCAAGAAGAAATGTGACGGAGCTGCCGCAAAGCTA
TCGGGCTTCTGGAATCAACGCTGTAGCGTATTACCGAGGCCCTGATGTGTCGTCAACCG
ACTAGCGGAGACGTGTTGTCGGCAACAGACGCTCTAATGACGGGTTACCGGCCAC
TTTGACTCAGTGTACTGTAACACATCGCTCACCCAGACAGTCGACTCAGCTAA

```

(配列番号 NO 19)

【図 2-2】

Figure 2-2

```

MVRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQGIHHHHHVDPGPMGVAKAVDFVPVESMETTMRSPVFTD
NSSPPAQPQTFQVAHLHAPTGSKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLPNSVAATLGFAYMSKAHGVDPN
IRTGVRTITTGAPITYSTYKGFLADGGCGSGAYDIIICDECHSIDSTSILGIGTVLDQAETAGAR
LVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSSTGEIPFYGKAIPIEVIKGRHLIFCHSKKKCDELAALKL
SGFGINAVAYYRGLDVSVIPTSGDVVVVATDALMTGFTGDFDSVIDCNCVTVDF

```

(配列番号 NO 20)

【図3-1】

Figure 3-1

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCTAGCAAACCACCA  
 AGTGGAGGAGCAGGAAATTCAACCACCATCACCACTACCGACGTGGATCCGGGCCCATTGGGTTGCGA  
 AGCGGTCGACTTATCCCCGTGGAGAGCCTAGAAACAACCATGAGGTCCCCGGTGTTCACAGAC  
 AACTCCTCCCCGCCAGCAGTGCCTCAGAGCTTCAGGTGGCCACCTGCATGCTCCCACCGGCAG  
 CGGTAAAGAGCACCAAGGTCCCAGCGCATATGGGCTCAGGGCTACAAAGTCTGGTGCTCAACC  
 CCTCCGTTGCTGCAACATTGGGCTTGGTCTACATGTCCAAGGCCATGGGATTGATCCTAAC  
 ATCAGGACTGGGTAAGGACAATTACTACTGGCAGCCCCATCACGTAACCTACGGCAAGTT  
 CCTTGGCGACGGCGGGTGTCTCGGGGGTGTCTATGACATAATAATTGTGACGAGTGCACACTCCA  
 CAGATGCAACATCTATTTGGGCATCGGCACTGTCTTGACCAAGCAGAGACTGCAGGGCGAGA  
 CTGGTGTGCTTGCACCGCTACCCCTCGGGCTCGTCACTGTGCCCATCTAATATCGAGGA  
 GGTGCTCTGTCCACCAACGGAGAGATCCCCTTTACGGCAAGGCTATCCCCCTTGAGGCAATCA  
 AAGGGGGAGACATCTCATCTTGCACCTCAAAGAAGAAGTGCAGCACTCGCCGCAAACCG  
 GTCGCGTTGGGTGTCATGCCGTGGCTTACTACCGCGCCCTTGACGTGCCGTATCCGACCAAG  
 TGGCGATGTTGTCGTGGCAACTGATGCTCATGACCGGTTTACCGGTGACTTCGACTCGG  
 TGATAGACTGTAATACGTGTGTCACCCAGACAGTCGACTTCAGCTAA

(配列番号 NO 21)

【図3-2】

Figure 3-2

MVRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQGIHHHHHVDPGPMSGVAKAVDFIPVESLETTMRSPVFTD  
 NSSPPAVPQSFQVAHLHAPTGSKSTKVPAAAYAAQGYKVLVLNPSVAATLGFAGYMSKAHGIDPN  
 IRTGVRTITTGSPITYSTYKGFLADGGCGGAYDIIICDECHSTDATSI LGIGTVLDQAETAGAR  
 LVVLATATPPGSVTVPHPNIEEVALSTTGEIPFYGKAIPLEAIKGGRHLIFCHSKKKCDELAAKP  
 VALGVNAVAYYRGLDVPVIPTSGDVVVVATDALMTGFTGDFDSVIDCNCVTQTVDFS

(配列番号 NO 22)

【図 4-1】

Figure 4-1

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATTGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC  
 CACCAAGTGGAGGAGCAGGAATTCAACCACCATCACCACGTGGATCCGGGCCATG  
 GCCGCAGGATTGGGCCCCCCCATAGGTGTAGCAAAAGCCCTACAGTTCATACCAGTGGAA  
 ACCCTTAGTACGCAGGCTAGGTCTCCATCTTCTGTACAATTCAACTCCTCCTGCTGTC  
 CCACAGAGCTATCAAGTAGGGTATCTCATGCCCGGACCGGCAGCGGTAAGAGCACAAAG  
 GTCCCGCCGCTTATGTAGCACAGGATATAATGTTCTCGTGTGAATCCATCGGTGGCG  
 GCCACACTAGGCTCGCTCTTCAATGTCGCGTGCCTATGGGATCGACCCCCAACATCCGC  
 ACTGGGAACCGCACCGTCACAACACTGGTGTAAACTGACCTATTCCACCTACGGTAAGTTT  
 CTCGCGGACGGGGTTGCTCCGGGGGGCATATGATGTAATTATCTGTGATGAATGTCAT  
 GCCCAAGACGCCACTAGCATATTGGCATAGGCACGGTCTTAGATCAGGCCGAGACGGCT  
 GGGGTGAGGCTGACGGTTTAGCGACAGCAACTCCCCCAGGCAGCATCACTGTGCCACAT  
 TCTAACATCGAGGAAGTGGCCCTGGGCTCTGAAGGTGAGATCCCTTCTACGGTAAGGCT  
 ATACCGATAGCCCTGCTCAAGGGGGGGAGACACCTCGTCTTGCCTTCCAAAGAAAAAA  
 TGTGATGAGCTAGCATCCAAACTCAGAGGTATGGGCTCAACGCTGTGGCTACTATAGG  
 GGTCTCGATGTTCCGTACATACCAACAGGAGACGTCGTGGCTACTGACGCC  
 CTCATGACTGGATTCACTGGAGACTTCGATTCTGTACAGACTGCAACGTGGCTTGAA  
 CAGTACGTTGACTTCAGCTAA

(配列番号 NO 23)

【図 4-2】

Figure 4-2

MVRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQGIHHHHHVDPGPMAAGLGPIGVAKALQFIPVE  
 TLSTQARSPSFSDNSTPPAVPQSYQVGYLHAPTGSGKSTKVPAAYVAQGYNVLVLNPSVA  
 ATLGFGSFMSRAYGIDPNIRGNRTVTGAKLTYSTYKGFLADGGCSGGAYDVIICDECH  
 AODATSILGIGTVLDQAETAGVRLTVLATATPPGSITVPHSNIEEVALGSEGEIPFYGKA  
 IPIALLKGGRHLVFCHSKKKCDELASKLRGMGLNAVAYYRGLDVSIVPTGDDVVVCATDA  
 LMTGFTGDFDSVIDCNVAVEQYVDFS

(配列番号 NO 24)

【図5-1】

Figure 5-1

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC  
 CACCAAGTGGAGGAGCAGGGATTACCATCACCATCACCACTGGATCCCAGGCCCCATG  
 GCCGCAGGATTGGGCCCCACCATAGGTGTAGCAAAAGCCCTACAGTTACCATACAGTGGAA  
 ACCCTTACGACACAGGCTAGGTCTCCATCTTCTCTGACAATTCAACTCCTCTGCTGTT  
 CCACAGAGCTATCAAGTAGGGTACCTCATGCCCGACCGGCAGCGTAAGAGCACAAAG  
 GTCCCGGGCGCTTATGTAGCACAAGGATATACTGTTCTCGTGTGAATCCATCGGTGGCG  
 GCCACACTAGGCTTCGGCTTTCATGTCGCGTGCCTATGGGATCGACCCAAACATCCGC  
 ACTGGGAACCGCACCGTTACAACACTGGTGTAAACTGACCTATTCCACCTACGGTAAGTT  
 CTTGCGGATGGGGTTGCTCCGGGGGATATGATGTGATTATCTGTGATGAGTGTGTCAT  
 GCCCAAGACGCTACTAGCATATTGGGTATAGGCACGGCTTAGATCAGGGCGAGACGGCT  
 GGGGTGAGGCTGACGGTTTAGCGACAGCGACCCCCCAGGCAGCATCACTGTGCCACAT  
 TCTAACATCGAAGAAGTGGCCCTGGGCTTGAGGGTGAGATCCCCTCTACGGCAAGGCT  
 ATACCGATATCCCTGCTCAAGGGGGGGAGGCACCTTATCTTGTGCAATTCAAAAAAAAG  
 TGTGATAAGATAGCGTCAAACAGAGGCATGGGCTCAACGCTGTAGCGTACTATAGA  
 GGTCTCGATGTGTCGTCATACCAACACAGGAGACGTCGTAGTTGCGCTACTGACGCC  
 CTCATGACTGGATACACCGGGGACTTCGATTCTGTATAGACTGCAACGTGGCTGAA  
 CAGTACGTTGACTTCAGCTAA

(配列番号NO 25)

【図5-2】

Figure 5-2

MVRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQGIHHHHHVDPGPMAAGLGPTIGVAKALQFI PVE  
 TLSTQARSPS FSDNS TPPAVPQSYQVGYLHAPTGSGKSTKPVAAVAQGYTVLVLNPSVA  
 ATLGFGSFMSRAYGIDPNIRTGNRTVTGAKLYSTYKGFLADGGCSGGAYDVIICDECH  
 AQDATSILGIGTVLDQAEAGVRLTVLATATPPGSITVPHSNIEEVALGSEGEIPFYGKA  
 IPISLLKGGRHLIFCHSKKKCDKIASKLRGMGLNAVAYYRGLDVSIVPTGDVVVCATDA  
 LMTGYTGDFDSVIDCNVAVEQYVDFS

(配列番号NO 26)

【図6-1】

Figure 6-1

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC  
 CACCAAGTGGAGGAGCAGGAAATTCAACCACCATCACCACGTGGATCCCAGGCCCAG  
 GGCCTGGCCAAGTCCATAGACTTCATCCCCGTTGAGACACTCGACATCGTTACGCGTCC  
 CCCACCTTATGTGACAACAGCACGCCACCGGCTGTGCCAGACCTATCAGGTGGTAC  
 TTGCATGCCCAACCGGCAGCGGAAAGAGCACCAAAGTCCCCGTCGCATACGCCGCCAG  
 GGGTATAAAGTGTAGTGCTCAATCCCTCGGTGGCTGCTACCCCTGGGTTGGAGCGTAC  
 CTGTCCAAGGCACACGGCATCAATCCCAACATTAGGACTGGAGTCAGGACTGTGACGACT  
 GGCAGGCCATCACGTACTCCACGTATGGCAAATTCTCGCCGATGGGGCTGCGCAGGT  
 GGCCTATGACATCATCATATGCGATGAATGCCACGCCGTGGATGCCACTACCATTCTC  
 GGCATCGGAAACAGTCCTGACCAAGCAGAGACAGCCGGGTCAGGCTAATGTGCTGGCT  
 ACAGGCCACGCCCCCGGGTCAGTGACAACCCCCCATCCAAACATAGAGGAGGTAGCCCTC  
 GGGCAGGAGGGTGAGACCCCCCTCTATGGGAGGGCGATCCCCCTGTCTACATCAAGGGA  
 GGGAGACACTTGATCTCTGCCACTCAAAGAAAAAGTGTGACGGAGCTCGCGGCGGCCCTC  
 CGGGCAGGGAGATGTAGTGGTCGTCGCCACCGACGCCCTCATGACGGGTTCACTGGAGAC  
 TTTGACTCCGTGATCGACTGCAATGTAGCGGTCACTCAAGTTGTAGACTTCAGCTAA

(配列番号 NO 27)

【図6-2】

Figure 6-2

MVRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQGIHHHHHHVDPGPMGVAKSIDFIPVETLDIVTRS  
 PTFSDNSTPPAVPQTYQVGYLHAPTGSKSTKVPVAYAAQGYKVLVLPNSVAATLGFGAY  
 LSKAHGINPNIRTVRTTGEAITYSTYKGFLADGGCAGGAYDIICDECHAVDATTIL  
 GIGTVLDQAETAGVRLTVLATATPPGSVTPHPNIEEVALGQEGETPFYGRAIPLSYIKG  
 GRHЛИFCHSKKKCDELAALRGMGLNAVAYYRGLDVSIPAQGDVVVATDALMTGFTGD  
 FDSVIDCNVAVTQVVDFS

(配列番号 NO 28)

【図7-1】

Figure 7-1

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCGTAGCAAAC  
 CACCAAGTGGAGGAGCAGGGAAATCACCATCACCATCACACGTGGATCCCAGGGCCATG  
 GGCCTAGCAAATCATTGACTCATCCCTGTTGAATCTCTCGATATCGCCTCACGGTCA  
 CCCAGTTCTCTGACAACAGCACGCCACCAGCTGTGCCCTCAGTCCCTACCAGGTGGCTAT  
 TTGCA CGGCCAACGGGAGCGGGAGAGACCAAGGTCCCTGTCGCATATGCTAGTCAG  
 GGGTATAAAGTACTCGTCTAAATCCCTCTGTCGCCACGCTCGGCTTCGGGGCCTAC  
 ATGTCAAAGCCCACGGGATCAACCCAAACATCAGAACCGGGGTACGGACTGTGACCACC  
 GGGGACCCCATCACCTACTCCACTTATGCAAGTTCTCGCAGATGGGGCTGCTCAGCC  
 GGCCTATGATGTCACTATGCGATGAATGCCACTCAGTGGACGCTACTACCACCTT  
 GGCATTGGAACAGTCCTCGACCAGGCCAGACCGCAGGGTGCTAGGTTAGGGTTAGCC  
 ACAGCCACGCCCTCGGTACAGTGACAACCTCATAGCAACATAGAGGGTGGCTCTT  
 GGTCA TGAAGGCAGATCCCTTCTACGGCAAGGCTATTCCCTAGCTTCAAGGGG  
 GGCAGACACCTAATCTTGCCATTCAAAGAAGAAGTGCATGAGCTCGCAGGCCCTT  
 CGGGGATGGGTGTCAACGCCGTTGCTACTATAGGGGTCTCGACGTCTGTTATACCA  
 ACTCAAGGAGACGTGGTGGTCGTTGCCACCGATGCCCTAATGACTGGATAACACCGGTGAC  
 TTTGACTCTGTTATTGACTGCAACGTTGCCGTTCTCAAATTGTAGACTTCAGCTAA

(配列番号 NO 29)

【図7-2】

Figure 7-2

MVRSSSQNSDKPVAHVANHQVEEQGIHHHHHVDPGPMGVAKSIDFI PVESLDIASRS  
 PSFSDNSTPPAVPQSYQVGYLHAPTGSGKSTKVPVAYASQGYKVLVLPNSVAATLGFGAY  
 MSKAHGINPNIRTGVRTVTTGDPITYSTYKGFLADGGCSAGAYDVIICDECHSVDATTIL  
 GIGTVLDQAE TAGARL VV LATA T PPGTVTTPHSNIEEVALGHEGEIPFYGKAIPLAFIKG  
 GRHLIFCHSKKCDELAAALRGMGVNAVAYYRGLDVS IPTQGDVVVVATDALMTGYTGD  
 FDSVIDCNVAVSQIVDFS

(配列番号 NO 30)

【図 8-1】

Figure 8-1

ATGGTAAGATCAAGTAGTCAAAATTGAGTGACAAGCCTGTAGCCCACGTCTAGCAAAC  
 CACCAAGTGGAGGAGCAGGAATTCAACCATCACCATCACCAAGCTGGATCCCAGGGCCATG  
 GGCCTAGCCAAATCCATTGACTTCATCCCCGTTGAGTCTCTCGACATCGTACTAGGTCT  
 CCAAGCTTCACTGACAACAGTACACCTCCAGCCGTGCCTCAGACCTACCAAGTGGGTAT  
 CTCCACGCGCCCACTGGTAGCGGGAGAGTACCAAGGTCCCTGCAGCGTACGCCGCTCAG  
 GGGTACAAGGTCTGGTACTGAACCCCTCCGTGGCTGCCACTTGGGATTTGGGCCTAC  
 ATGTCAAAAGCGCACGGAGTCATCCAAATATCAGGACCGGGGTTCGCACGGTGAACACT  
 GGGGATCCCATCACCTACTCCACGTATGGCAAATTCTCGCAGATGGAGGCTGCTCTGGA  
 GGCCTATGGCATCATAATATGCGACGAATGCCATTGACGGACTCCACGACCATCCTC  
 GGCATCGGGACCCTCGACCAAGCTGAGACAGCTGGAGTTAGGTTGGTGGCTTGGCC  
 ACGCGCACCCACCCGGATCTGTAACAACCCCACACCCAAACATAGAGGAGGTGGCCCTC  
 GGCCACGAGGGCGAAATCCCCTCTATGGGAAGGCATCCCTCTCAACCATCAAGGGA  
 GGACGACATCTAATCTCTGTCTAAAGAAAAAGTGCAGCAGCTCGCGGTGGCCCTC  
 CGAGCGATGGGCCTTAACCGGGTGGCATACTACAGAGGGCTTGACGTCTCGTGTACCA  
 ACACAAGGAGACGTGGTGGTCGCCACCGACGCCCTCATGACAGGATATACTGGAGAC  
 TTCGACTCTGTGACTGCAACATGGCGCTCTCAAATTGTAGACTCAGCTAA

(配列番号 NO 31)

【図 8-2】

Figure 8-2

MVRSSSQNS SDKPVAHVVANHQVEEQGIHHHHHVDPGPMGVAKSIDFIPVESLDIVTRS  
 PSFTDNSTPPAVPQTYQVGYLHAPTGSKSTKVPAAQGYKVLVLPNSVAATLGF  
 GAYMSKAHGVNPNIIRTGVRTVNTGDPITYSTYKGFLADGGCSGGAYGIIICDECHSTDSTTIL  
 GIGTVLDQAE TAGVRLVVLATATPPGSVTTPHPNIEEVALGHEGEIPFYGKAIPLSTIKG  
 GRHLIFCHSKKCDLAVLRAMGLNAVAYRGLDVSIPTQGDVVVVATDALMTGYTGD  
 FDSVIDCNMAVSQIVDFS

(配列番号 NO 32)

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In national Application No PCT/EP 99/02547																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 G01N33/543 G01N33/576 C07K14/18 C12Q1/70 G01N33/573																				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N C07K																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category *</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">EP 0 139 526 A (WARNER-LAMBERT COMPANY) 2 May 1985 (1985-05-02) claims 7, 8, 10</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-17</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">WO 97 12043 A (CHIRON CORPORATION) 3 April 1997 (1997-04-03) page 20, line 9 - line 19 page 19, line 9 - line 25</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">25, 32</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">-----</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">18-35</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">WO 96 04385 A (INNOGENETICS NV) 15 February 1996 (1996-02-15) cited in the application claims 1-6</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">18-35</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-----</td> <td style="text-align: left; padding: 2px;">-----</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">-----</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	EP 0 139 526 A (WARNER-LAMBERT COMPANY) 2 May 1985 (1985-05-02) claims 7, 8, 10	1-17	X	WO 97 12043 A (CHIRON CORPORATION) 3 April 1997 (1997-04-03) page 20, line 9 - line 19 page 19, line 9 - line 25	25, 32	A	-----	18-35	A	WO 96 04385 A (INNOGENETICS NV) 15 February 1996 (1996-02-15) cited in the application claims 1-6	18-35	-----	-----	-----
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	EP 0 139 526 A (WARNER-LAMBERT COMPANY) 2 May 1985 (1985-05-02) claims 7, 8, 10	1-17																		
X	WO 97 12043 A (CHIRON CORPORATION) 3 April 1997 (1997-04-03) page 20, line 9 - line 19 page 19, line 9 - line 25	25, 32																		
A	-----	18-35																		
A	WO 96 04385 A (INNOGENETICS NV) 15 February 1996 (1996-02-15) cited in the application claims 1-6	18-35																		
-----	-----	-----																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.																		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "a" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the International search report																		
15 July 1999		22/07/1999																		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5018 Paterlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Van Bohemen, C																		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 99/02547

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 139526 A	02-05-1985	AU 549315 B AU 3448584 A JP 60126300 A	23-01-1986 26-04-1985 05-07-1985
WO 9712043 A	03-04-1997	AU 7238496 A CA 2226293 A EP 0850308 A	17-04-1997 03-04-1997 01-07-1998
WO 9604385 A	15-02-1996	AU 3382495 A BR 9506059 A CA 2172273 A EP 0721505 A JP 9503396 T	04-03-1996 28-10-1997 15-02-1996 17-07-1996 08-04-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークド (参考)
C 1 2 N 9/00		C 1 2 Q 1/25	
15/09	Z N A	1/68	A
C 1 2 Q 1/25		G 0 1 N 33/573	A
1/68		33/576	Z
G 0 1 N 33/573		C 1 2 N 5/00	A
33/576		15/00	Z N A A
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72) 発明者 アルフォンス・ボスマン ベルギー、バー1745オプウェイク、フルスト165番			
(72) 発明者 エル温・サブロン ベルギー、バー1785メルヒテム、ロブレークラーン1ア番			
(72) 発明者 マーン・ズレイン フランス、エフ-59910ポンデュ、ドメヌ・ドゥ・ラ・ヴィーヌ201番			